



**Departamento de Bioquímica**

**Papel de la GTPasa Rab8 en migración  
e invasión tumoral**

**TESIS DOCTORAL**

**JOSÉ JAVIER BRAVO CORDERO**

**Madrid, 2007**



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UAM

# **Papel de la GTPasa Rab8 en migración e invasión tumoral**

**TESIS DOCTORAL**

**JOSÉ JAVIER BRAVO CORDERO**

**Licenciado en Ciencias Biológicas**

**Realizada en:**

**Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)**  
C/ Melchor Fernández Almagro, 3  
Madrid

**Dirección:**

**María Concepción Montoya Sánchez**

Madrid, Octubre de 2007

*Resumen*

Rab8 es un miembro de la familia de las Rab GTPasas, que pertenecen a la superfamilia de las Ras GTPasas. En este trabajo, hemos abordado el estudio de aspectos novedosos de la función de esta GTPasa como son su papel en migración e invasión tumoral.

En primer lugar, estudiamos el papel de Rab8 en la regulación del transporte de la metaloproteinasa de matriz tipo-1, MT1-MMP, uno de los factores críticos en el proceso invasivo. La localización subcelular de esta proteína en el frente invasivo es muy importante para llevar a cabo su actividad pro-invasiva. Sin embargo, el mecanismo encargado de esta distribución polarizada no está del todo claro. En este trabajo hemos analizado células MDA-MB-231 durante la migración a través de matrices tridimensionales de colágeno. Estos estudios pusieron de manifiesto que la exocitosis polarizada, inducida por la adhesión vía integrinas es necesaria para la re-distribución de MT1-MMP a las estructuras invasivas. Comprobamos que las vesículas que transportaban MT1-MMP son positivas para el marcador de la ruta biosintética VSV-G, pero no para marcadores de la ruta de reciclaje como Rab11/Tf/TfR lo que supone la implicación del tráfico biosintético en el transporte de MT1-MMP. El tráfico polarizado de MT1-MMP es activado por la adhesión a través de integrina  $\beta 1$ , y ésta integrina es necesaria para la localización de MT1-MMP en estas estructuras. Además, el mutante constitutivamente activo de Rab8 inducía el transporte de MT1-MMP así como la degradación e invasión dependiente de MT1-MMP, mientras que el silenciamiento de Rab8, pero no de Rab11, inhibía estos procesos. Estos estudios ponen de manifiesto la existencia de una nueva ruta de reclutamiento de MT1-MMP hacia estructuras invasivas, el tráfico exocítico, que resulta crítica para la actividad pro-invasiva de este enzima. Esta nueva ruta de transporte de MT1-MMP hacia estructuras invasivas está regulada a su vez por la GTPasa Rab8.

Para estudiar el papel de la GTPasa Rab8 en el proceso migratorio, estudiamos células silenciadas para este gen, con las que realizamos ensayos de migración aleatoria así como dirigida por estímulos quimiotácticos o el cierre de herida. Dichas células mostraban una pérdida de la direccionalidad de la migración. Estas células mostraron una pérdida de la polaridad y un notable reordenamiento del citoesqueleto celular. El mutante constitutivamente activo de Rab8 inducía la polimerización de actina cortical así como la pérdida de adhesiones focales y fibras de estrés, mientras que el silenciamiento génico de Rab8 producía un incremento en fibras de estrés y adhesiones focales. Estos efectos son dependientes de la activación de Rac y la inhibición de Rho. Como demuestran los ensayos de “*pull-down*”, Rab8 incrementa la captura de GTP por Rac. Rab8 está implicado también en el desensamblaje de las adhesiones focales. En su conjunto estos datos revelan un nuevo papel para Rab8 en motilidad celular regulando el establecimiento de la polaridad, recambio de adhesiones focales y polimerización de actina lo que determina, en última instancia, la direccionalidad de la migración.

*Summary*

Rab8 is a small Ras-related GTPase that regulates polarized membrane transport to the plasma membrane and cell shape. In this work, we have undertaken the study of novel aspects of this GTPase, namely its role in tumor cell migration and invasion.

First, we have studied the role of Rab8 in regulating the transport of MT1-MMP to invasive structures during invasion. MT1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is one of the most critical factors in the invasion machinery of tumor cells. Subcellular localization to invasive structures is key for MT1-MMP proinvasive activity. However, the mechanism driving this polarized distribution remains obscure. We now report that polarized exocytosis of MT1-MMP occurs during MDA-MB-231 adenocarcinoma cell migration into collagen type I three-dimensional matrices. Polarized trafficking of MT1-MMP is triggered by  $\beta 1$  integrin-mediated adhesion to collagen, and is required for protease localization at invasive structures. Localization of MT1-MMP within VSV-G/Rab8-positive vesicles, but not in Rab11/Tf/TfRc-positive compartment in invasive cells, suggests the involvement of the exocytic traffic pathway. Furthermore, constitutively active Rab8 mutants induce MT1-MMP exocytic traffic, collagen degradation and invasion, whereas Rab8- but not Rab11-knockdown inhibited these processes. Altogether, these data reveal a novel pathway of MT1-MMP redistribution to invasive structures, exocytic vesicle trafficking, which is crucial for its role in tumor cell invasiveness. Mechanistically, MT1-MMP delivery to invasive structures, and therefore its proinvasive activity, is regulated by Rab8 GTPase.

To address the role of Rab8 GTPase in the migratory process we analyzed Rab8 shRNA silenced cells, which showed compromised directional persistency of cell motility, chemotaxis towards EGF gradients, and wound closure. These cells displayed defects in cell polarity and cytoskeletal rearrangements. Rab8 silenced cells displayed a dramatic increase in actin stress fibers and focal adhesions. Rab8 constitutively active mutant induced cortical actin polymerization and disappearance of actin stress fibres and focal adhesions. These effects were dependent on Rac activation and Rho inhibition. As revealed by pull-down assays, Rab8 activation increased GTP loading of Rac. Rab8 was also involved in focal adhesion turnover, promoting disassembly of these structures. Altogether, these data reveals a novel role of Rab8 in cell motility by regulating the establishment of cell polarity, turnover of focal adhesions and actin cytoskeleton rearrangements thereby determining directionality of cell migration.

# ***ÍNDICE***

## **I. INTRODUCCIÓN.....1**

### **1. LA MIGRACIÓN CELULAR**

#### **1.1. RELEVANCIA DE LA MIGRACIÓN CELULAR**

- 1.1.1 Migración durante el desarrollo**
- 1.1.2 Migración en homeostasis y procesos fisiopatológicos**
- 1.1.3 Migración en la patología del cáncer**
  - 1.1.3.1 Metástasis
  - 1.1.3.2 Invasión tumoral

#### **1.2. ETAPAS DEL PROCESO DE MIGRACIÓN**

- 1.2.1. Adhesión celular**
- 1.2.2. Reordenamientos del citoesqueleto**
  - 1.2.2.1 La adhesión focal como inicio de la señalización
  - 1.2.2.2 Dinámica de la adhesión focal
- 1.2.3. Procesos de degradación de matriz extracelular**

### **2. TRÁFICO INTRACELULAR DE VESÍCULAS**

- 2.1. LAS PROTEÍNAS Rab, ORGANIZADORES DEL TRANSPORTE VESICULAR**
- 2.2. LA GTPasa Rab8**

## **II. OBJETIVOS.....22**

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS.....24**

### **1. CULTIVOS CELULARES**

- 1.1. Tipos celulares y condiciones de cultivos**
- 1.2. Geles tridimensionales de colágeno (3D-Col I), matrices bidimensionales (2D) y microesferas recubiertas de matriz extracelular**
- 1.3 Transfecciones y plásmidos**

### **2. ESTUDIOS DE MICROSCOPÍA**

- 2.1 Ensayos de microscopia en célula fijada**
  - 2.1.1. Captura de transferrina/LDL y experimentos con Ts 045 VSV-G**
  - 2.1.2. Reclutamiento de vesículas a microesferas recubiertas de matriz extracelular**

- 2.1.3. Ensayos de degradación de colágeno
- 2.2. Ensayos de microscopia en célula viva
  - 2.2.1. Ensayos de tráfico vesicular
  - 2.2.2. Experimentos de fotoblanqueamiento
- 3. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN
  - 3.1. Ensayos de invasión y quimiotaxis
  - 3.2. Ensayos de migración aleatoria sobre matrices 2D
  - 3.3 Ensayos de cierre de herida
- 4. DETERMINACIÓN DE LA POLARIZACIÓN CELULAR
- 5. SILENCIAMIENTO GÉNICO
  - 5.1. Transducción retroviral para la generación de línea estables silenciadas para Rab8 y Rab11
  - 5.2. Silenciamiento transitorio de Rab8
- 6. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE SRC KINASA, MEK, P38, JNK Y PI3K
- 7. ENSAYO DE DESENSAMBLAJE DE ADHESIONES FOCALES
- 8. ENSAYOS BIOQUÍMICOS
  - 8.1. Análisis de proteínas
  - 8.2. Ensayos de “pull-down”
- 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### **IV. RESULTADOS.....38**

- 1. MT1-MMP SE REDISTRIBUYE A LAS ESTRUCTURAS DURANTE LA INVASIÓN TUMORAL
- 2. EL TRÁFICO INTRACELULAR COMO EL RESPONSABLE DE MT1-MMP A PUNTOS DE ANCLAJE AL COLAGENO
  - 2.1. Microscopía de célula viva para visualizar el tráfico intracelular de MT1-MMP
  - 2.2. Experimentos de FRAP-FLIP
- 3. IMPLICACIÓN DE LA ADHESIÓN VIA INTEGRINAS EN EL RECLUTAMIENTO DE MT1-MMP



- 3.1. Papel de la matriz extracelular
- 3.2. Rutas de señalización implicadas en el transporte de MT1-MMP
- 4. RUTA DE TRÁFICO IMPLICADA EN EL TRANSPORTE DE VESÍCULAS DE MT1-MMP EN CÉLULAS INVASIVAS
- 5. Rab8 PERO NO Rab11 CO-LOCALIZA CON MT1-MMP EN VESÍCULAS DE EXOCITOSIS Y SE MOBILIZA POR LA ADHESIÓN A COLÁGENO
- 6. Rab8 REGULA EL TRÁFICO DE MT1-MMP HACIA ESTRUCTURAS INVASIVAS, LA DEGRADACIÓN DE COLÁGENO Y LA INVASIÓN DEPENDIENTE DE MT1-MMP
- 7. Rab8 ESTÁ IMPLICADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA DIRECCIONALIDAD EN LA MIGRACIÓN ALEATORIA Y EN LA MIGRACIÓN DIRIGIDA POR ESTÍMULOS EXTERNOS
- 8. Rab8 DETERMINA LA MORFOLOGÍA Y POLARIDAD CELULAR
- 9. Rab8 PROMUEVE REORDENAMIENTOS DEL CITOESQUELETO DE ACTINA Y REGULA LA FORMACIÓN DE ADHESIONES FOCALES
- 10. LAS GTPasas DE LA FAMILIA Rho MEDIAN LOS REORDENAMIENTOS DEL CITOESQUELETO INDUCIDOS POR Rab8
- 11. Rab8 ES NECESARIO PARA EL DESENSAMBLAJE DE LAS ADHESIONES FOCALES

## **V. DISCUSIÓN.....67**

- 1. REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE MT1-MMP EN CÉLULAS INVASIVAS
  - 1.1. Señalización mediada por integrinas durante el reclutamiento de MT1-MMP a estructuras invasivas
  - 1.2. Reclutamiento de MT1-MMP a estructuras invasivas en matrices tridimensionales
  - 1.3. Modelo para el tráfico de MT1-MMP
- 2. Rab8 EN INVASIÓN TUMORAL: REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE MT1-MMP
- 3. PAPEL DE Rab8 EN MIGRACION TUMORAL
  - 3.1. Papel de Rab8 en polarización celular
  - 3.2. Rab8 regula la actividad de las Rho GTPasas, afectando al citoesqueleto y a la migración celular
  - 3.3. Rab8 y el desensamblaje de la adhesión focal

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>83</b> |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b> | <b>85</b> |

## *Abreviaturas*

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Gran parte de las abreviaturas y acrónimos proceden del inglés y como tal se han mantenido.

3D-Col I: Geles tridimensionales de colágeno  
ASEF: APC-Stimulated Guanine Nucleotide Exchanged Factor  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CC: Constitutive Cycling  
CCD: Charge-Coupled Device  
Col I: Colágeno tipo I bovino  
CSF-1: Colony-Stimulating Factor 1  
Dil-LDL: Low Density Lipoprotein conjugada con 3,3'-Dioctadecilindocarbocina  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
EF: Factor elíptico  
EGF: Epidermal Growth Factor  
ERM: Ezrina, Radixina, Moesina  
FAK: Focal Adhesion Kinase  
FLIP: Flourescence Lose In Photobleaching  
FN: Fibronectina  
FRAP: (Fluorescence Recovery After Photobleaching  
FRNK: FAK Related Non-Kinase Domain  
GAPs: Proteínas activadoras de la actividad GTPasas  
GCK: Germinal Central Kinase  
GDF: Factores que desplaza el GDI  
GDIs: Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina  
GDP: Guanosín difosfato  
GEFs: Factores intercambiadores de nucleótidos  
GFP: Green Fluorescente Protein  
GTP: Guanosín trifosfato  
GTPasa: Guanosina Trifosfatasa  
HA: Ácido hialurónico  
ID: Indice de Direccionalidad  
LDL: Low Density Lipoprotein  
LMW-PTP: Low Molecular Weight-Protein Tyrosine Phosphatase  
MAP: Mitogen Activated Protein  
MDCK: Marbin-Darby Canine Kidney  
MEFs: Mouse Embryonic Fibroblast  
MMP: Matrix MetaloProtease  
mRFP: Monomeric Red Fluorescente Protein  
MT1-MMP: Membrane Type I- Matrix MetaloProtease  
MTOC: MicroTubules Organizing Center  
PDGF: Platelets Derived Growth Factor  
PDGFR: Platelets Derived Growth Factor Receptor  
PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa  
PTP-PEST: Protein Tyrosine Phosphatase containing Proline (P), Glutamic Acid (E), Serine (S) and Threonine (T).  
Rab: Ras genes from Rat Brain.  
RE: Reticulo Endoplásmico  
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis  
SFB: Suero Fetal Bovino  
Tf: Transferrina

TGN: Trans Golgi Network

TNF- $\alpha$ : Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$

TrR: Transferrin Receptor

Ts045 VSV-G: Ts045 Vesicular Stomatitis Virus-Glicoprotein

WT: Wild Type

YFP: Yellow Fluorescent Protein

## **Palabras clave relacionadas con la tesis:**

Cáncer, invasión tumoral, migración celular, metaloproteinasas, tráfico de membranas, MT1-MMP, Rab8.

## ***I. Introducción***

## 1. LA MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un proceso esencial, que tiene lugar tanto en organismos unicelulares, la ameba p.e, como en organismos multi-celulares, desde plantas hasta mamíferos (Cotran et al., 1994). La migración juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, así como a lo largo de la vida de un organismo; tanto en la fisiología del organismo adulto, como en procesos fisiopatológicos (p.e. la reparación de heridas y los procesos inflamatorios), así como en diversas patologías.

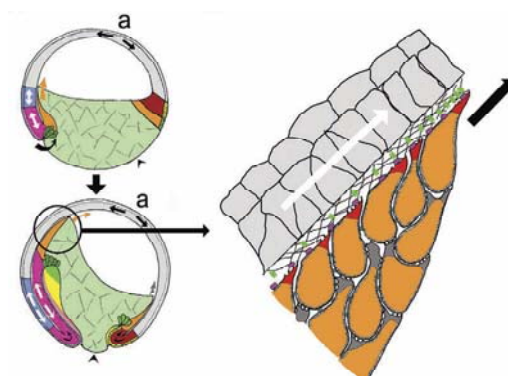
### 1.1. RELEVANCIA DE LA MIGRACIÓN CELULAR

#### 1.1.1. Migración celular durante el desarrollo

La migración celular interviene en el desarrollo embrionario, más concretamente durante la gastrulación, en la que grupos de células del blastocisto migran para formar las tres capas del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Fig. 1). Recientes trabajos muestran, cómo esta migración, depende de la interacción de células con la matriz fibrilar, rica en fibronectina, que se encuentra en el blastocelo (Ramos et al., 1996). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelets Derived Growth Factor*) y su receptor PDGFR (*Platelets Derived Growth Factor Receptor*) guían a las células en este proceso (Nagel et al., 2004). Posteriormente, células de estas capas migrarán hasta diferentes localizaciones, donde se diferenciarán para generar los tejidos y órganos (Keller, 2005).

Es importante destacar, que el proceso de desarrollo continúa a lo largo de la vida del organismo, ya que muchas células, como ocurre con las células de la piel (keratinocitos) y del intestino (epiteliales), nacen, migran y mueren continuamente, permitiendo regenerar estos órganos. Durante el desarrollo del sistema nervioso, las células primitivas neuronales migran fuera del tubo neural y se alojan en diferentes capas. Desde aquí mandan proyecciones (axones y dendritas) hasta células receptoras con las que forman conexiones específicas, llamadas sinapsis, que permiten llevar a cabo tareas complejas como el aprendizaje y la memoria.





(Adaptado de Keller, 2005)

**Figura 1.** Diagrama de secciones mid-sagital de la gastrulación temprana y tardía del anfibio, que muestra la dirección de migración del mesodermo (naranja) hacia el polo animal (a). Un aumento de esa zona muestra la morfología y la actividad protrusiva (en rojo) de estas células.

### 1.1.2. Migración en homeostasis y procesos fisiopatológicos

Las células del sistema inmune están constantemente circulando por el organismo y migrando a través de tejidos para, en caso de reconocer un antígeno extraño, desencadenar la respuesta inmunológica. Para estas células es muy importante desarrollar la capacidad de discernir entre las células propias del organismo y las células extrañas, con el fin de evitar que se produzcan respuestas autoinmunes. Este reconocimiento de lo propio se adquiere en estadios tempranos del desarrollo, cuando los linfocitos migran a través del tejido linfóide primario de la médula ósea y del timo.

La migración es importante en procesos fisiopatológicos como la reparación de tejidos y la respuesta inflamatoria, procesos que suelen ocurrir conjuntamente. Por ejemplo, cuando se produce una herida, se inicia un proceso de cierre que implica la proliferación y migración de células que la cubren, reparando el daño. Al mismo tiempo, la liberación de citoquinas y quimioatrayentes por mastocitos, macrófagos y células del estroma producen el reclutamiento de células del sistema inmune a la zona dañada. Una vez allí, las células del sistema inmune hacen frente a la infección producida por bacterias u otros microorganismos.

### 1.1.3. Migración en la patología del cáncer

La migración no solo contribuye en la fisiología del organismo adulto, sino que también juega un papel muy importante en procesos patológicos, tales como la enfermedad vascular, la osteoporosis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, el retraso mental y el cáncer. De ahí el enorme interés por conocer en profundidad los mecanismos que regulan la migración celular, con el fin de desarrollar nuevas terapias para atacar dichas enfermedades. En este trabajo nos hemos interesado en la patología del cáncer, donde la migración celular tiene gran importancia en los procesos de metástasis.

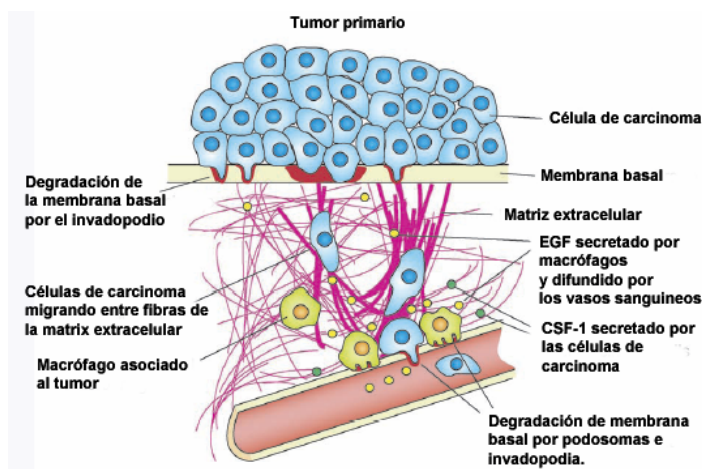
#### 1.1.3.1. Metástasis

La metástasis, o diseminación de células cancerosas desde el tumor primario hasta un órgano distante, es la mayor causa de muerte de pacientes con cáncer. Ésta, implica la migración e invasión de células tumorales a tejidos adyacentes, la intravasación en el torrente sanguíneo y vasos linfáticos, y la posterior extravasación e invasión de tejidos distantes (Fig. 2). Todas estas etapas han de ser completadas con éxito para generar un tumor metastásico (Woodhouse et al., 1997). Las células invasivas adquieren un fenotipo migratorio asociado al aumento de expresión de determinados genes implicados en motilidad celular (Wang et al., 2004a).

Los tumores humanos más comunes son los denominados carcinomas, formas de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular. Para la intravasación, las células de carcinoma han de atravesar la densa membrana basal, penetrando en la matriz extracelular del tejido. Tras invadir la matriz fibrilar entran en contacto con la membrana basal que subyace el endotelio vascular, y que deben degradar para atravesar la barrera de células endoteliales e introducirse en el torrente circulatorio. Las células deben sobrevivir en la circulación sanguínea hasta que alcancen un nuevo órgano, al cual, se van a extravasar invadiendo el tejido donde han de seguir creciendo para generar micrometástasis pre-angiogénicas, que generarán el nuevo tumor.

Recientes avances en la tecnología de la imagen microscópica han desvelado nuevos detalles de la migración de células tumorales, demostrando que la migración de éstas es más complicada de lo que se había propuesto, implicando agentes

quimioatrayentes, matriz extracelular, e interacciones con las células del estroma (Condeelis and Segall, 2003).



(Adaptado de Yamaguchi et al., 2005)

**Figura 2.** Modelo de intravasación de células de carcinoma de mama.

#### 1.1.3.1. Invasión tumoral

La invasión tumoral es un proceso activo de translocación de células neoplásicas a través de la matriz de un tejido. La adquisición de este comportamiento invasivo es uno de los primeros pasos en el proceso metastásico. La invasión de células tumorales conlleva los procesos de adhesión celular, transducción de señales intracelulares (que genera una polaridad y contractilidad celular), y proteólisis de componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal, que da como resultado la migración celular (Liotta, 1986).

## 1.2. ETAPAS DEL PROCESO DE MIGRACIÓN

El proceso de migración fue establecido hace ya más de 30 años. Tiene lugar en diversas etapas que se van sucediendo de manera cíclica (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Para que una célula migre debe anclarse a un sustrato mediante los mecanismos de adhesión celular, que se constituyen como componentes clave en el proceso migratorio, por lo que se tratarán con detalle más adelante. La respuesta inicial de una célula a un estímulo migratorio es la de polarizarse y extender una protrusión en la dirección de avance. Los reordenamientos del citoesqueleto están perfectamente

coordinados con la adhesión celular, ya que la protrusión inicial esta dirigida por el reconocimiento de la matriz extracelular, a través de moléculas de adhesión, que promueven la polimerización de filamentos de actina. Los receptores de adhesión de la familia de las integrinas (Hynes, 2002), así como los proteoglicanos, como la glicoproteína CD44 (Aruffo et al., 1990), unen componentes de la matriz extracelular jugando un papel crucial en este proceso.

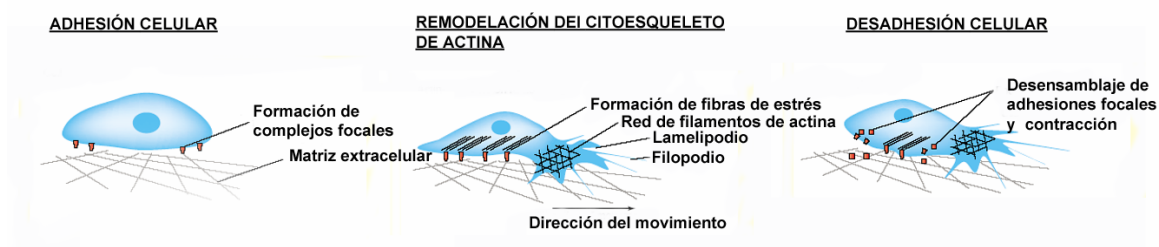
La capacidad de la célula para establecer una propulsión inicial depende de la polimerización de filamentos de actina. Dicha propulsión puede ser en forma de lamelipodio, filopodio o pseudópodo (estructura cilíndrica más gruesa que los filopodios, y que se denomina invadopodio cuando tiene lugar la degradación de matriz extracelular (Welch and Mullins, 2002)), dependiendo de las vías de señalización implicadas. Cada una de estas formaciones tiene una morfología y dinámica característica. En el lamelipodio, la actina se organizanda como una red muy ramificada, mientras que en los filopodios se polimerizan en forma de paquetes paralelos de fibras.

En los sitios donde la célula se ancla al sustrato, a través de receptores de adhesión, se produce el ensamblaje intracelular de proteínas adaptadoras y transductoras de señales, formándose los llamados complejos focales. Éstos, constituyen puntos de tracción para la célula en el proceso migratorio, que se forman en la parte delantera, maduran, y se deslizan en la dirección del movimiento para desensamblarse en la parte trasera, liberando el contacto con la matriz extracelular para permitir el avance de la célula (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Otey and Burridge, 1990; Zamir et al., 2000) (Fig. 3).

Los mecanismos básicos de migración en las células normales se conservan en las células tumorales, estos implican: señalización por integrinas, polimerización de actina, formación de contactos focales, y degradación de componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, en el caso de la invasión tumoral, a diferencia de los procesos fisiológicos, la prevalencia de estímulos migratorios, en ausencia de señales de inhibición, genera un desbalance que permite a las células tumorales abandonar el tumor primario invadiendo tejidos, llevando a la expansión del tumor a través de las barreras de los tejidos, y promoviendo la metástasis.

El proceso de migración descrito anteriormente ha sido principalmente estudiado en fibroblastos migrando sobre superficies planas recubiertas por diferentes sustratos (superficies 2D). Esto ofrece una visión simplificada de la realidad, ya que los

mecanismos que regulan la migración dentro de un tejido son mucho más complejos por encontrarse la célula rodeada de una densa matriz fibrilar. Esto conlleva la necesidad de la célula para abrirse camino en un medio tridimensional, generalmente mediante proteólisis de la matriz extracelular. Aquí es donde adquieren especial relevancia las metaloproteinasas de matriz como MT1-MMP.



(Adaptado de Carragher and Frame, 2004)

**Figura 3.** Regulación de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina durante la motilidad celular

### 1.2.1. Adhesión celular

Dependiendo del tipo celular y de la composición de la matriz extracelular la migración se regula por diferentes moléculas de adhesión, siendo las principales las de la familia de las integrinas. Cada integrina se compone de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Hasta la fecha se conocen 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , que dan lugar a 24 pares  $\alpha\beta$ . Cabe destacar, en el campo de la migración, las siguientes integrinas:  $\alpha 5\beta 1$  que une fibronectina (Cukierman et al., 2001),  $\alpha 6\beta 1$  o  $\alpha 6\beta 4$  que unen laminina, (Rabinovitz and Mercurio, 1997),  $\alpha V\beta 3$  que une fibronectina o vitronectina (Leavesley et al., 1992) y  $\alpha 2\beta 1$  que une colágeno (Maaser et al., 1999).

La mayoría de las integrinas no se encuentran constitutivamente activas, sino que se expresan en la superficie celular en su forma inactiva; solo en el estado activo se unen a sus ligandos. La modulación de la actividad de las integrinas por sus ligandos se produce a través de la señalización “de dentro a fuera” (*inside-out*). Las rutas de señalización activadas por estímulos quimiotácticos son unas de las conocidas rutas “de dentro a fuera” (Schwartz et al., 1995; Williams et al., 1994) que regulan las propiedades adhesivas (o avidéz) de las integrinas, modulando la afinidad de éstas por sus respectivos ligandos, y su reagrupamiento en distintas regiones de la membrana.

La unión del ligando a las integrinas produce cambios en la actividad de quinasas citoplasmicas, GTPasas y fosfolipasas, desencadenando la cascada de transducción de señales conocida como “de fuera a dentro” (*outside-in*) (Hynes, 1992).

La unión de las integrinas a sus sustratos permite el reclutamiento de diferentes proteinasas, que degradan los distintos componentes de la matriz extracelular. Entre éstas se encuentran proteinasas solubles como MMP-2, que se une a  $\alpha V\beta 3$  (Brooks et al., 1998), o MT1-MMP, que colocaliza con  $\beta 1$  o  $\beta 3$  al adherirse a fibras de colágeno (Ellerbroek et al., 2001; Galvez et al., 2002; Paulus et al., 1996).

Se han descrito alteraciones en la expresión de diferentes integrinas en varios tipos de tumores (Mizejewski, 1999), y el aumento de afinidad de las integrinas por sus ligandos se ha correlacionado con un fenotipo más migratorio e invasivo de células tumorales.

Junto con las integrinas, las glicoproteínas de superficie celular, juegan un papel fundamental en la interacción entre las células y la matriz extracelular. Uno de estos receptores, la glicoproteína CD44, tiene una función importante en adhesión, regulando procesos de motilidad celular. CD44 es una proteína integral de membrana que está sujeta a procesamiento alternativo, y actúa como receptor de adhesión uniéndose principalmente al ácido hialurónico (HA). Esta molécula se ha relacionado clásicamente con la progresión tumoral, dado que su expresión está alterada en células malignas en comparación con tejidos normales (Naor et al., 2002). Aunque la mayoría de los trabajos coinciden en señalar el papel de CD44 en la regulación de la migración de células tumorales (Lamb et al., 1997; Okamoto et al., 1999; Peck and Isacke, 1996; Weber et al., 2002), otros niegan esta implicación (Driessens et al., 1995; Maaser et al., 1999). La región citosólica de la molécula CD44 interacciona con miembros de la familia de las ERM (*E*zrina/*R*adixina/*M*oesina) (Legg and Isacke, 1998; Tsukita et al., 1994). Las proteínas ERM son importantes en migración celular, ya que unen los filamentos de actina a la membrana plasmática y a diferentes receptores de superficie, incluido CD44 (Tsukita et al., 1994). CD44 se asocia también con proteinasas de matriz extracelular como MT1-MMP, MMP7 y MMP9 (Bourguignon et al., 1998; Mori et al., 2002; Okamoto et al., 1999; Yu and Stamenkovic, 1999).

### 1.2.2. Reordenamientos del citoesqueleto

Los reordenamientos del citoesqueleto de actina y la formación de las adhesiones focales están estrechamente regulados por mecanismos de transducción de señales. La familia de las Rho GTPasas son fundamentales en este proceso. La familia Rho es un conjunto de GTPasas pertenecientes a la superfamilia de Ras. Se expresan ubicuamente y se han identificado veinte miembros en mamíferos, siete en *Drosophila melanogaster*, cinco en *Caenorhaiditis elegans*, y quince en *Dyctyosteilum discoideum* (Schultz et al., 1998). Estas GTPasas son de gran interés, ya que integran las señales provenientes de los factores de crecimiento y receptores de adhesión, regulando el delicado balance que debe existir para el crecimiento y la migración. Esto les conlleva a adquirir gran relevancia en patologías como el cáncer.

Las GTPasas son sensores moleculares que siguen una estrategia muy simple para controlar complejos procesos celulares. Estas proteínas ciclan entre dos estados conformacionales, uno unido a GTP (activo) y el otro unido a GDP (inactivo). Las GTPasas son activas biológicamente solo cuando unen GTP, ya que en esta conformación son capaces de interactuar con efectores. El ciclo de activación/desactivación de las GTPasas está finamente regulado por tres grupos de proteínas: (i) los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que promueven el cambio de GDP por GTP activando las GTPasas, (ii) las proteínas activadoras de la actividad GTPasas (GAPs), que potencian la hidrólisis de GTP a GDP (como p190 RhoGap, que será motivo de estudio en este trabajo), y (iii) los GDIs (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina), que bloquean el ciclo de las GTPasas secuestrando y solubilizando la forma unida a GDP en el citoplasma, lejos de la cara interna de la membrana plasmática donde estas proteínas ejercen su función (Moon and Zheng, 2003; Schmidt and Hall, 2002; Zheng, 2001). Una vez activadas, las GTPasas son capaces de interactuar con diferentes efectores para generar las respuestas (Bishop and Hall, 2000). En la actualidad se han identificado más de cuarenta efectores, cincuenta GEFs y cuarenta GAPs para la familia de Rho. Dentro de esta familia nos ocuparemos de Rho, Rac y Cdc42, y su papel en la migración celular. Rac está implicado en la polimerización de actina, la generación de protrusiones de tipo lamela (Ridley et al., 1992) y la formación de los complejos focales (Nobes and Hall, 1995b). Por el contrario, Rho regula la contracción y las fuerzas de retracción necesarias entre el cuerpo celular y la parte trasera de la célula para permitir el movimiento. Rho

también regula la formación de fibras de estrés y el ensamblaje de adhesiones focales, (Ridley and Hall, 1992) promoviendo la maduración a partir de los complejos focales (Webb et al., 2002). El tercer miembro de esta familia de GTPasas, Cdc42, es esencial para la formación de filopodios y de complejos focales nacientes (Nobes and Hall, 1995a).

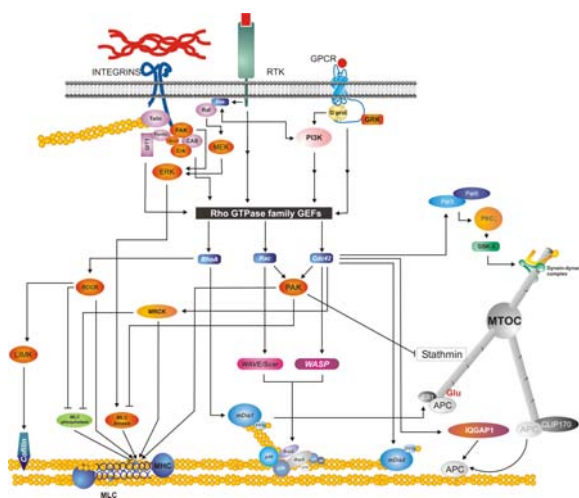
#### 1.2.2.1. La adhesión focal como inicio de la señalización

La célula se adhiere a la matriz extracelular a través de las integrinas que se activan y se agrupan en la membrana plasmática. Los dominios citoplasmáticos de las dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , que componen la estructura de la integrina reclutan más de 50 proteínas. Entre éstas se encuentran proteínas de señalización y proteínas estructurales, lo cual genera una conexión entre los receptores que median la adhesión, y el citoesqueleto de actina, así como sitios de transducción de señales al interior celular (Vicente-Manzanares et al., 2005) (Fig. 4) Las adhesiones focales son sitios donde se producen estas conexiones que tienen lugar a través de múltiples interacciones proteína-proteína. Esto, permite a la célula construir diversos complejos de señalización, que darán lugar a diferentes comportamientos celulares (DeMali et al., 2003; Geiger and Bershadsky, 2001; Geiger and Bershadsky, 2002; Wehrle-Haller and Imhof, 2002; Yamada et al., 2003). Uno de los principales procesos que tiene lugar en la adhesión focal, y que va a desencadenar cascadas de transducción de señales, son las fosforilaciones en residuos de tirosinas de diversas proteínas. FAK (Focal Adhesion Kinase) es uno de los componentes clave en la señalización en la adhesión focal. Se activa inicialmente mediante autofosforilación en tirosina 397 (Schaller et al., 1994), fosforilación inducida por la adhesión de las integrinas a su ligando, lo cual promueve el reclutamiento de FAK. Una vez autofosforilado, el residuo Y397 se constituye como lugar de unión para la tirosina quinasa Src (de sarcoma), que fosforila a FAK en los residuos Y576 y Y577, y que promueve la activación de FAK (Calalb et al., 1996). La defosforilación de tirosinas es también de gran importancia para la regulación de la adhesión focal (Angers-Loustau et al., 1999). Una de las fosfatasas mayoritarias en la adhesión focal es PTP-PEST (Protein Tyrosine Phosphatase containing Proline (P), Glutamic Acid (E), Serine (S) and Threonine (T)).

Junto con las tirosin quinasas y fosfatasas, en la adhesión focal aparecen un conjunto de moléculas adaptadoras como son: p130Cas, paxilina, vinculina, Crk y  $\alpha$ -



actinina entre otras. La fosforilación de una de ellas, p130Cas, genera sitios de unión de moléculas como Crk, Nck y PTP-PEST, desencadenando diferentes cascadas de señalización (Sakai et al., 1994). Paxilina es una proteína estructural que se une a los dominios SH3 de Src (Turner, 2000); también puede unirse directamente a la cola citoplásmica de la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas, y a la cola citoplásmica de la integrina  $\alpha 4$  (Liu et al., 2002). Vinculina es otra proteína estructural que se une a diversos componentes de la adhesión como paxilina (Turner et al., 1990), F-actina (Huttelmaier et al., 1997), talina (Johnson and Craig, 1994) o  $\alpha$ -actinina (Kroemker et al., 1994).



**Figura 4.** Esquema que resume las diferentes proteínas que componen la señalización a través de integrinas y sus efectos a nivel de citoesqueleto.

(Adaptado de Vicente-Manzanares et al., 2005)

Las adhesiones focales son estructuras bien caracterizadas. La mayoría de los estudios relacionados con las adhesiones focales se han realizado con células cultivadas sobre superficies 2D recubiertas de componentes de matriz extracelular. Este contexto es muy diferente del ambiente fisiológico en el que se encuentran normalmente las células, donde están en contacto con múltiples componentes de matriz extracelular, lo que implica la activación de diferentes integrinas. Además, el entorno biofísico en condiciones fisiológicas, difiere de las condiciones de estudio 2D. Recientes estudios en matrices 3D, que se utilizan como modelo de estudio al simular las condiciones fisiológicas, demuestran como las adhesiones focales tiene una composición, tamaño y señalización diferente, lo que conlleva un comportamiento migratorio diferente (Cukierman et al., 2001; Grinnell et al., 2003; Wozniak et al., 2003).

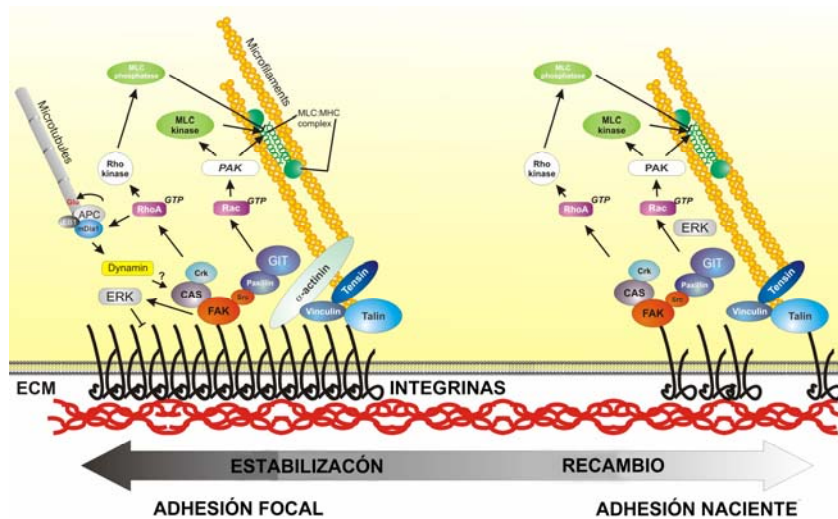
#### 1.2.2.2. Dinámica de la adhesión focal

Actualmente estamos muy alejados de conocer los mecanismos moleculares que regulan la dinámica de la adhesión focal, en parte porque el orden de reclutamiento de las distintas moléculas, las vías de señalización, y las diferentes reorganizaciones del complejo focal son muy complejas y poco conocidas. Sin embargo, en base a la literatura actual, podemos establecer un esquema general de dinámica de la adhesión.

La adhesión se origina como un pequeño complejo focal en asociación con el lamelipodio o el filopodio, cuya formación depende de Rac o Cdc42 respectivamente. Estos complejos focales tienen una vida media corta, y pueden, o bien desensamblarse y desaparecer en unos minutos, o bien madurar dando lugar a adhesiones focales (Kaverina et al., 2002). Normalmente, el aumento de complejos focales va relacionado con un aumento en la motilidad celular. Estos complejos focales se caracterizan por reclutar paxilina y  $\alpha$ -actinina (Laukaitis et al., 2001), que posteriormente dejan paso a otras moléculas como talina, vinculina y FAK. La maduración de estos complejos a adhesiones focales está mediada por Rho (Rottner et al., 1999) (Fig. 5). Este proceso tiene lugar a través de dos efectores de Rho: mDia y Rho quinasa. mDia afecta a la polimerización de actina, y Rho quinasa estimula la contracción de miosina, que es necesaria para la formación de la adhesión focal y el mantenimiento de ésta. En este momento, zyxina y tensina se reclutan a estas nuevas estructuras (Zaidel-Bar et al., 2003).

En el desensamblaje de la adhesión focal se ha implicado la actividad de proteinasas como la calpaina, proteínasa dependiente de calcio que degrada diferentes proteínas de la adhesión como talina, paxilina, FAK, Src,  $\alpha$ -actinina y tensina (Bhatt et al., 2002).

Por su parte, los microtúbulos tienen una función muy importante en el desensamblaje de la adhesión focal (Kaverina et al., 1998). Hay diversas teorías acerca de cómo los microtúbulos ejercen dicha función. La idea general establece que éstos mediarían el transporte de impulsos de relajación, que promueve el desensamblaje de la adhesión focal.



(Adaptado de  
Vicente-  
Manzanares M.  
et al., 2005)

**Figura 5.** Modelo de dinámica de la adhesión focal.

Diversas proteínas, en concreto GEFs de Rho y Rac, son transportadas sobre los microtúbulos y en los extremos de los mismos. Estas proteínas podrían descompensar el estado de activación de estas GTPasas, promoviendo el desensamblaje de la adhesión. Entre otros, se ha descrito que ASEF (APC-Stimulated Guanine Nucleotide Exchanged Factor), un GEF de Rac, se activa en los extremos de microtúbulos promoviendo la activación de Rac, permitiendo el desensamblaje de la adhesión (Kawasaki et al., 2000). Otra teoría propone que la inactivación de Rho en las inmediaciones de la adhesión focal, debido al secuestro por parte de los microtúbulos de GEFs de Rho como GEF-H1, promovería el desensamblaje (Enomoto, 1996; Krendel et al., 2002). Estas teorías han sido cuestionadas en un trabajo de Ezratty EJ (Ezratty et al., 2005) en el que se demuestra que el desensamblaje de la adhesión focal es independiente de la actividad de las Rho GTPasas.

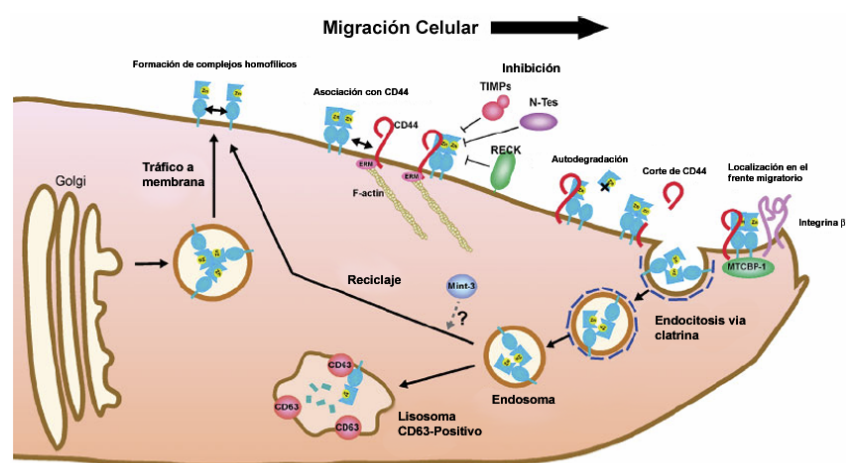
Otros estudios sugieren que la Kinesina-1, una proteína motora que media el transporte de vesículas a lo largo de los microtúbulos, está implicada en la dinámica de la adhesión. Estos estudios se basan en el hecho de que el bloqueo de Kinesina-1 induce un incremento en el tamaño de la adhesión focal durante el crecimiento de microtúbulos, después del tratamiento con nocodazol (Krylyshkina et al., 2002). Estos estudios sugieren que los motores de kinesina están transportando una señal a la adhesión vía microtúbulos que permite su desensamblaje.

### 1.2.3. Procesos de degradación de matriz extracelular

El reciente desarrollo de los modelos de migración tridimensional ha puesto de manifiesto la importancia de los procesos de degradación de matriz extracelular, de los cuales, los principales responsables son las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las MMPs forman una familia de proteinasas zinc-dependientes que degradan específicamente los componentes de la matriz extracelular. La familia de las MMPs se dividen en dos grandes grupos: (i) las que se secretan al medio extracelular en forma soluble, y (ii) las de tipo membrana (MT). Estas últimas se caracterizan por estar ancladas a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana tipo I y una corta cola citoplásmica (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP y MT5-MMP), un dominio glicosfingolípido (MT4-MMP MT6-MMP) o bien un dominio transmembrana tipo II (MMP23) (Egeblad and Werb, 2002).

La metaloproteinasa de matriz extracelular de membrana tipo-1 (MT1-MMP) ha sido ampliamente estudiada por ser una enzima asociada a malignidad tumoral (Egeblad and Werb, 2002). Además, la sobreexpresión de MT1-MMP potencia la invasividad de las células, y la pérdida de expresión suprime la invasión y la migración celular, demostrando que esta enzima es una de las proteínas claves de la maquinaria invasiva (Itoh and Seiki, 2006; Sato et al., 2005). MT1-MMP fue la primera MMP de tipo membrana que se identificó, y se caracteriza por activar metaloproteinasas de tipo soluble como pro-MMP2 (progelatinasa A) en la membrana plasmática. Para llevar a cabo su función proteolítica MT1-MMP ha de ser procesada por la convertasa furina, que elimina el propéptido de la zona C-terminal, siendo transportada a membrana en su forma activa como proteína de membrana tipo I (Osenkowski et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual MT1-MMP activa llega a membrana no es conocido. Una vez activada, MT1-MMP proteoliza componentes de la matriz extracelular como: colágeno tipo I, II y III, fibronectina, vitronectina, agrecan, lumican, fibrina, laminina - 1 y -5, gelatina o caseína, entre otros (Itoh and Seiki, 2004). Además de los diferentes componentes de la matriz extracelular MT1-MMP también actúa sobre: (i) otras proteasas como pro-MMP2 y pro-MMP13, (ii) moléculas de adhesión como CD44, que es el receptor para ácido hialurónico, (iii) pro- $\alpha_v$  integrina, (iv) transglutaminasa, (v) el receptor de la lipoproteína de baja densidad y (vi) sindecano (Itoh and Seiki, 2006; Sato et al., 2005). La actividad enzimática de MT1-MMP puede ser inhibida por TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, no así por TIMP-1 (Will et al., 1996).

Dado el amplio rango de sustratos que son procesados irreversiblemente por MT1-MMP, y el hecho de que la enzima esté expresada en la membrana plasmática en su forma activa (Mazzone et al., 2004; Sato et al., 1994), parece claro que MT1-MMP ha de estar regulada de forma muy precisa para controlar su actividad en la superficie celular (Osenkowski et al., 2004). Los mecanismos clásicos de regulación de la actividad de MT1-MMP se llevan a cabo a diferentes niveles, incluyendo: regulación transcripcional, procesamiento intracelular del zymógeno inactivo (Mazzone et al., 2004; Sato et al., 1994) e inhibición a través de inhibidores endógenos (TIMP-2, RECK o testican) (Nakada et al., 2001; Oh et al., 2001; Will et al., 1996). Recientemente se han descrito mecanismos más precisos de regulación de la actividad de MT1-MMP en la superficie celular, como: (i) internalización (Galvez et al., 2002; Jiang et al., 2001; Uekita et al., 2001; Wang et al., 2004b), (ii) reciclaje (Remacle et al., 2003; Wang et al., 2004b), (iii) procesamiento autocatalítico, resultando la conversión en un producto de degradación inactivo (Lehti et al., 2000; Stanton et al., 1998; Tam et al., 2002), (iv) oligomerización (Galvez et al., 2005; Itoh et al., 2001; Lehti et al., 2002; Rozanov et al., 2001) y (v) regulación post-transduccional (Wu et al., 2004) (Fig. 6). La localización subcelular en estructuras invasivas es otro aspecto importante de la regulación de MT1-MMP, y constituye un requisito importante para que esta enzima lleve a cabo su actividad pro-invasiva (Lehti et al., 2000; Mori et al., 2002; Nakahara et al., 1997). Si bien, los mecanismos que llevan a esta distribución polarizada todavía no han sido dilucidados.



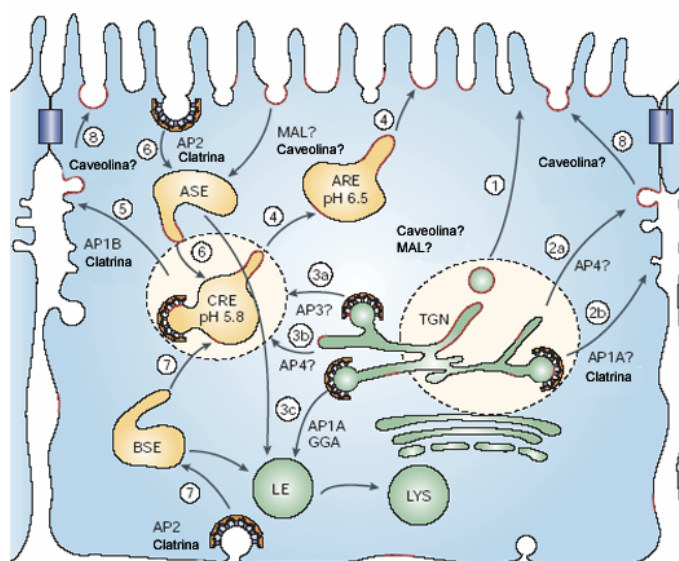
**Figura 6. Modelo propuesto para la regulación celular de MT1-MMP.** MT1-MMP se regula a diferentes niveles: transcripción, tráfico hacia la membrana plasmática, formación de complejos homofílicos, asociación con CD44, autodegradación, inhibición por TIMPs, N-Tes y RECK. MT1-MMP se internaliza vía caveolas y vía clatrina, reciclando posteriormente a membrana o degradándose en los lisosomas. (Adaptado de Itho and Seiki, 2006).

## 2. TRÁFICO INTRACELULAR DE VESÍCULAS

El tráfico de membrana es un proceso altamente regulado y que está implicado en funciones básicas de la célula como: la secreción de proteínas, la captura de nutrientes, la internalización de moléculas de superficie y la degradación de proteínas unidas a membrana. El logro en la realización de todas estas tareas depende de la regulación de todas ellas, de ahí que sea un proceso altamente controlado.

El transporte intracelular de proteínas y lípidos se basa en su compartimentalización en poblaciones de vesículas que son transportadas de forma dirigida para fusionarse en compartimentos celulares específicos. La presencia de diferentes compartimentos intracelulares requiere un alto grado de regulación para asegurar un transporte de la carga correcto.

A finales de los años 80, las principales rutas de tráfico: biosintético, endocítico, reciclaje y transcitosis, fueron caracterizadas en estudios realizados en células epiteliales (Rodriguez-Boulán and Powell, 1992; Simons and Wandinger-Ness, 1990) (Fig. 7). Existen dos rutas de endocitosis, (i) la clásica: endocitosis mediada por clatrina, responsable de la internalización de nutrientes, patógenos, antígenos, factores de crecimiento y receptores, y (ii) la no clásica, la endocitosis independiente de clatrina y dependiente de caveolas, cuya existencia ha sido controvertida durante mucho tiempo. Las vesículas endocitadas forman los endosomas tempranos, que, o bien son transportados de vuelta a la membrana a través de las rutas de reciclaje, o bien son degradados en los endosomas tardíos que dan lugar a los lisosomas donde se produce la degradación. La ruta biosintética es la responsable de transportar proteínas y lípidos desde la región del trans-golgi, TGN (*Trans Golgi Network*) hacia la membrana plasmática, ya sea de una forma directa, o a través de los endosomas de reciclaje como recientemente se ha demostrado (Ang et al., 2004). La transcitosis consiste en el transporte, dentro de la misma célula, que transcurre con la endocitosis de una molécula en un lado de la célula, y la exocitosis a otro lado (Tuma and Hubbard, 2003).



**Figura 7. Rutas de tráfico de vesículas en células epiteliales.**

Rutas exocíticas apicales: 1 y 4.

Rutas exocíticas basolaterales: 2 y 5.

Rutas endocíticas: 6 y 7.

Ruta biosintética a través de endosomas: 3.

Transcitosis: 8.

TGN: Red del Trans Golgi.

CRE: Endosomas de reciclaje.

ARE: Endosomas de reciclaje apicales  
AP1A, AP1B, AP2, AP3, AP4 :Proteínas adaptadoras.

LYS: Lisosoma

LE: Endosoma tardío

BSE: Endosomas basales de distribución

(Adaptado de Rodríguez-Boulán et al., 2005)

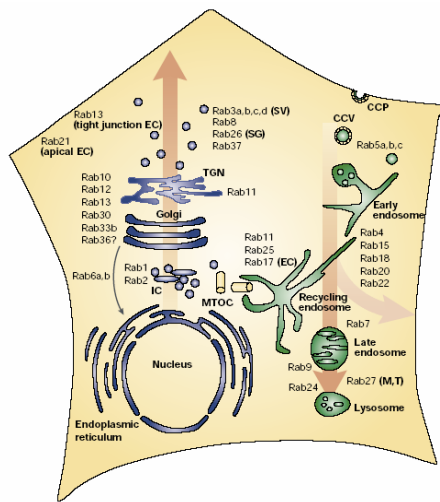
La precisión con la que transcurre este tráfico intracelular de membranas depende de la presencia de proteínas específicas en las vesículas de transporte, las proteínas motoras, que transportan vesículas a orgánulos, circulando a través del citoesqueleto celular. Dos son las redes que soportan este transporte, la red de actina y la red de microtúbulos, siendo la primera una red de transporte lenta y de corta distancia, mientras que la segunda es de transporte rápido y mayor alcance. El transporte mediado por el citoesqueleto de actina está dirigido por los miembros de la familia de las miosinas (Seabra and Coudrier, 2004; Tuxworth and Titus, 2000), mientras que las kinesinas y las dineínas son las proteínas motoras implicadas en el transporte vía microtúbulos (Hirokawa and Takemura, 2004). Asimismo, son de vital importancia los factores que anclan las vesículas a sus orgánulos de destino y promueven la fusión de membranas. La regulación del tráfico interno de membranas se lleva a cabo por lípidos como los fosfoinosítidos o GTPasas, cuya síntesis o activación puede producirse localmente en donde es requerido; lo que confiere flexibilidad y especificidad al tráfico de vesículas. Los fosfoinosítidos se forman a partir del fosfatidilinositol mediante la fosforilación por quinasas específicas en las posiciones 3, 4 y 5, pasando a ser reconocidos por proteínas de membrana. Dos grandes familias de GTPasa regulan el tráfico intracelular de vesículas, las Arf GTPasas y las Rab GTPasas. Las GTPasas de ambas familias se localizan en orgánulos específicos en la célula, y reclutan un gran número de efectores en su estado activo, unido a GTP, regulando el tráfico intracelular; sin embargo, difieren en el mecanismo por el cual se anclan a

membrana para activarse. De las Rab GTPasas nos ocuparemos con detalle en el siguiente apartado, al ser la proteína objeto de este estudio un miembro de esta familia.

## 2.1. LAS PROTEÍNAS Rab, ORGANIZADORES DEL TRANSPORTE VESICULAR

Las proteínas denominadas Rab (Ras genes from *RAt Brain*) constituyen una amplia familia de pequeñas GTPasas monoméricas. Once proteínas Rab han sido descritas en *S. Cerevisiae*; y se estima que en humanos hay algo más de 63 miembros de esta familia. Estas proteínas se distribuyen en diferentes compartimentos intracelulares y regulan el transporte entre orgánulos (Grosshans et al., 2006; Novick and Zerial, 1997; Zerial and McBride, 2001) (Fig. 8). Las proteínas de la familia Rab, al igual que otras GTPasas, actúan como conmutadores moleculares que ciclan entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). Este intercambio está también controlado por GEFs, que inducen la unión de GTP, y por GAPs, que aceleran la hidrólisis de GTP a GDP. Los Rabs también están regulados en su proceso de anclaje a las membranas: las proteínas denominadas GDIs que se unen a los Rabs en su forma unida a GDP, enmascarando su sitio de unión a la membrana y manteniéndolo soluble en el citosol. El anclaje a la membrana requiere la función de un factor que desplaza el GDI (GDF), que disocia el GDI permitiendo a los Rabs unirse a membrana. Una vez unidos a la membrana los Rabs pueden ser activados por los GEFs, para unirse a sus efectores, ejerciendo sus funciones en la localización específica determinada por estos factores (Stein et al., 2003). Dentro de las funciones que se encuentran establecidas para las proteínas de la familia Rab, destacaremos: el anclaje de vesículas a su compartimento de destino, la fusión vesicular, y la interacción de vesículas con componentes del citoesqueleto.





**Figura 8. Mapa de la localización intracelular de las diferentes proteínas Rab.**

CCV: Vesículas recubiertas de clatrina.

CCP: Hoyo recubierto de clatrina.

EC: Célula epitelial.

M: Melanosomas.

MTOC: Centro organizador de microtúbulos.

SG: Gránulos secretores.

SV: Vesícula sináptica.

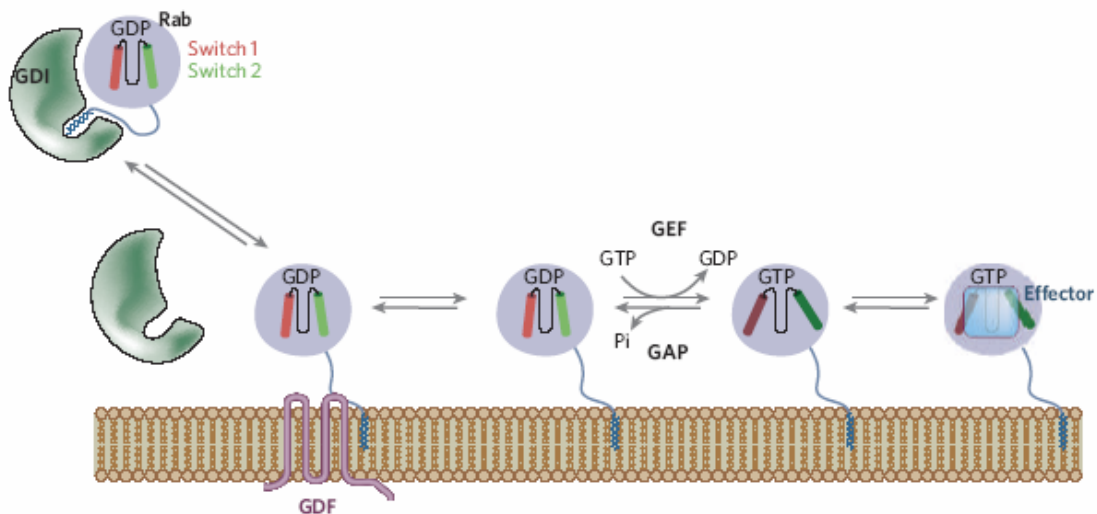
T: Gránulos de células B.

TGN: Red del transgolgi.

IC: Compartimento intermedio. Reticulo endoplásmico-golgi.

(Adaptado de Zerial and McBride, 2001)

Estas proteínas Rab regulan el reclutamiento específico de vesículas a través proteínas motoras a diferentes compartimentos, debido a su capacidad para determinar especificidad de compartimento. Además, regulan los eventos de fusión vesicular con la membrana receptora reclutando factores de anclaje, y determinan subdominios de membrana mediante su interacción con varios efectores para distribuir la carga.



(Adaptado de Behina and Munro, 2005)

**Figura 9. Reclutamiento de Rab GTPasas a membranas.**

## 2.2 La GTPasa Rab8

Rab8 es una GTPasa de la familia Rab que se expresa ubicuamente (Chavrier et al., 1990), y está implicada en la regulación del transporte biosintético hacia la membrana plasmática. El gen de Rab8 fue aislado por primera vez de una librería de células MDCK (*Marbin-Darby Canine Kidney*), presentando una alta homología con las proteínas Ypt1/Sec4 de levaduras que intervienen en diferentes pasos del transporte vesicular, más concretamente Ypt1, implicado en el transporte desde el retículo endoplásmico (RE) hasta el Golgi, y Sec4, que controla los últimos pasos de la ruta de secreción (Chavrier et al., 1990). Esta GTPasa se localiza en vesículas que son dirigidas desde la red del transgolgi (TGN) hasta la membrana plasmática. Inicialmente Rab8 se aisló como el gen MEL que se localizaba en una región del cromosoma 19, donde se produce una translocación asociada con una gran variedad de neoplasias incluyendo: melanoma (Parmiter et al., 1986) y carcinoma de célula pequeña del pulmón (Whang-Peng et al., 1986).

Rab8 promueve el transporte polarizado de membranas de nueva síntesis hacia la membrana plasmática en fibroblastos. La expresión ectópica de esta GTPasa produce un gran impacto en la morfología celular, afectando de forma importante tanto al citoesqueleto de actina como a los microtúbulos. El mutante constitutivamente activado de Rab8 (Rab8Q67L) promueve la desaparición del centro organizador de microtúbulos MTOC (*MicroTubules Organizing Center*), disminuyendo la densidad de la red de microtúbulos en el cuerpo celular. Asimismo, Rab8Q67L promueve la desaparición de fibras de estrés, y la polimerización de actina cortical en zonas lamelares de nueva formación (Peranen et al., 1996).

Esta proteína ha sido poco estudiada en comparación con otros miembros de la familia Rab implicados en endocitosis y reciclaje, como son Rab5 y Rab11 respectivamente, cuya función está bien caracterizada. Hasta el momento se han descrito varios GEFs para Rab8, entre los que se encuentran Rabin8 (Hattula et al., 2002) y MSS4 (Burton et al., 1994; Itzen et al., 2006; Knoblauch et al., 2007), y un GAP: AS160 (Miinea et al., 2005). Con respecto a los efectores, se han descrito tres proteínas que se unen a Rab8 en su estado activo (unido a GTP): (i) FIP-2 (Hattula and Peranen, 2000), optineurina, una proteína inducible por TNF- $\alpha$  que une Rab8 a Huntingtina modulando la morfología celular; (ii) Rab8ip/GCK (Rab8 *I*nteracting *P*rotein/ *G*erminal *C*entral *K*inase), (iii) y recientemente se ha descrito JFC-1, (Hattula

et al., 2006), miembro de la familia de proteínas sinaptotagmina-like 1. Optinuerina es la intermediaria en la unión de Rab8 a los filamentos de actina vía Miosina VI (Sahlender et al., 2005). La miosina VI es la encargada de transportar las vesículas hacia el extremo menos de los filamentos de actina (Wells et al., 1999). Esto permitiría el transporte de vesículas entre orgánulos intracelulares cortas distancias (Roberts et al., 2004). Posiblemente una kinesina continuaría con el transporte de la carga para transportarla distancias mayores hasta la membrana plasmática. Se ha descrito que la miosina VI se localiza en los lamelipodios de membrana en el frente de avance de células migratorias, donde co-localiza con Rab8 (Geisbrecht and Montell, 2002).

Otro efector de Rab8, GCK, es una quinasa que se encuentra en la ruta de activación en respuesta a estrés. GCK se expresa principalmente en las células B de los centros germinales, regulando algún paso dentro del transporte vesicular hacia la superficie celular en respuesta a un estímulo como TNF- $\alpha$  (Tumoral Necrosis Factor  $\alpha$ ), el cual se ha visto que aumenta la secreción de vesículas (Ren et al., 1996). Rab8 podría activar esta quinasa de dos posibles maneras: de forma directa, o a través de su reclutamiento a un lugar específico de la membrana.

Dentro de las funciones celulares que se han visto relacionadas con la GTPasa Rab8 se encuentran: el transporte de rodopsina a la membrana plasmática en los fotoreceptores de *Xenopus* (Moritz et al., 2001), y en el crecimiento de neuritas (Huber et al., 1995). También se ha descrito que Rab8 regula el transporte de melanosomas (Chabrilat et al., 2005; Chakraborty et al., 2003). Aunque inicialmente se implicó a Rab8 en la ruta de transporte basolateral, recientemente se ha demostrado que ratones deficientes en Rab8 mueren por fallos en la absorción intestinal de nutrientes, debido a deficiencias en el transporte apical de receptores a la membrana plasmática, claves en este proceso (Sato et al., 2007),.

## ***II. Objetivos***

## **OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo se centra en el estudio del papel de la GTPasa Rab8 en procesos de migración e invasión tumoral.

Con este fin analizaremos los siguientes puntos:

1. Implicación de la GTPasa Rab8 en invasión tumoral. Papel en el transporte de la metaloproteinasa de matriz MT1-MMP hacia estructuras invasivas durante el proceso de invasión.

2. Relevancia de la GTPasa Rab8 en migración tumoral, y su papel en la regulación de la polaridad celular y el reordenamiento del citoesqueleto celular.

### ***III. Materiales y métodos***

## 1. CULTIVOS CELULARES

### 1.1 Tipos celulares y condiciones de cultivo

En este trabajo todos los experimentos se han llevado a cabo con líneas celulares transformadas humanas. La mayoría de los estudios se han realizado en la línea celular establecida de carcinoma de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26).

También se ha trabajado con la línea tumoral 293T que a su vez es una sublínea de las células 293 (células humanas de riñón embrionario (HEK) transformadas con adenovirus tipo 5, (ATCC CRL-1573)), así como con la línea de fibrosarcoma humano HT1080 (ATCC CCL-121). La línea de fibroblastos de ratón embrionarios (MEF) silenciada para p190 RhoGap nos fue cedida por el Dr. Miguel Ángel del Pozo (Grande-García et al., 2007).

Las líneas celulares se han cultivado en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino, Hyclone), 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco) y 0,1% Plasmocin (Invivo Gen). Las células se han mantenido en incubadores a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células derivadas de tumores primarios fueron extraídas de muestras de tumor frescas de endometrio y pulmón de pacientes mediante digestión enzimática según protocolo descrito por Allinen (Allinen et al., 2004) y se cultivaron en medio HAMF10 (Gibco) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco) y 0,1% Plasmocin (Invivo Gen).

### 1.2 Geles tridimensionales de colágeno (3D-col I), matrices bidimensionales (2D) y microesferas recubiertas de matriz extracelular

Para los estudios realizados en geles tridimensionales de colágeno, las células ( $5 \times 10^5$  células) fueron embebidas en una mezcla de: solución de colágeno tipo I (2,4 mg/ml Colágeno tipo I bovino (Col I) (Vitrogen, Palo Alto, CA, USA)), 1X RPMI (Sigma), 19mM HEPES (Gibco), 0,19% bicarbonato sódico (Sigma) y 5% de suero). Las células fueron añadidas a la solución y posteriormente la polimerización de los geles fue inducida manteniendo la mezcla 2 horas a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Dependiendo del tipo de experimento que se llevase a cabo los geles se extendieron

sobre placas MATTEK (Mattek Corporation) o LAB-TEK II (Nalgene Nunc International) para estudios de célula viva, o en cubres de 12 mm para llevar a cabo técnicas inmunofluorescencias.

Para los experimentos sobre superficies 2D (dos dimensiones) las células se plaquearon sobre superficies recubiertas con colágeno de cola de rata 1mg/ml (Roche Diagnostics, Panzberg, Germany) o fibronectina (FN) (Sigma) a 20 µg/ml.

Las microesferas de poliestireno divinyl-benzene (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA) se prepararon según indicaciones del fabricante y se incubaron con 0,5% BSA (Albúmina de Suero Bovino), 100µg/ml Col I, 20µg/ml de FN, 1mg/ml ácido hialurónico (Sigma, St Louis, MO, USA) o TS2/16 Ab anti- integrina β1 durante toda una noche. Tras un tratamiento de sonicación, para disgregar los agregados, las microesferas se incubaron con las células a una proporción célula: microesfera 1:40.

### 1.3. Transfecciones y plásmidos

Para llevar a cabo las transfecciones las células se crecieron hasta alcanzar el 70% de confluencia. Todas las transfecciones se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), la proporción fue de 2 µl de Lipofectamina por cada µg de DNA, en un volumen de 500 µl de Optimem (Gibco).

| Proteína    | Proteína fluorescente | Excitación Máxima (nm) | Emisión Máxima (nm) | Origen                |
|-------------|-----------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| MT1-MMP     | GFP<br>mRFP           | 489<br>584             | 508<br>607          | Dr. Arroyo<br>Clonaje |
| Rab8 WT     | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Mellman           |
| Rab8 Q67L   | GFP<br>mRFP           | 489<br>584             | 508<br>607          | Dr. Mellman           |
| Rab8ΔC      | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Mellman           |
| Rab8-Mut    | mRFP                  | 584                    | 607                 | Clonaje               |
| Ts045 VSV-G | YFP                   | 514                    | 527                 | Dr. Peppercok         |
| Paxilina    | mRFP                  | 584                    | 607                 | Clonaje               |
| Rab11       | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Sheff             |
| Rho N19     | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Del Pozo          |



| Proteína  | Proteína fluorescente | Excitación Máxima (nm) | Emisión Máxima (nm) | Origen       |
|-----------|-----------------------|------------------------|---------------------|--------------|
| Rac N17   | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Del Pozo |
| Rho V14   | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Del Pozo |
| Rac V12   | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Del Pozo |
| CDC42 N17 | GFP                   | 489                    | 508                 | Dr. Del Pozo |

**Tabla 1.** Resumen de los plásmidos utilizados en este trabajo. Las construcciones denominadas “clonaje” hacen referencia a plásmidos generados en la unidad de Microscopía Confocal y Citometría del CNIO.

Para la generación de las líneas estables HT1080-GFP y HT1080-Rab8Q67L-GFP (*Green Fluorescent Protein*) se transfectaron células HT1080 con los plásmidos correspondientes y a las 24h se realizó una separación basada en citometría de flujo de aquellas células que tenían fluorescencia verde. A las 24 horas se les añadió G418 a 0,5mg/ml y se mantuvieron en cultivo para su selección.

## 2. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA

### 2.1 Estudios de microscopia en células fijadas

Las células, cultivadas en geles tridimensionales de colágeno o sobre cubreobjetos cubiertos o no por colágeno o fibronectina, fueron fijadas con paraformaldeido 4% durante 7 minutos y permeabilizadas con Triton X-100 0,5 X en TBS. Posteriormente, los sitios de unión inespecífica se bloquearon con TNB (0,1M Tris/HCL; 0,15M NaCl; 0,5% reactivo bloqueante (Boehringer Mannheim)) a 37°C durante 40 minutos a las concentraciones detalladas en la Tabla 2. Las incubaciones con los anticuerpos primarios fueron realizadas durante 40 minutos y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluorescencia (Alexa 488 (verde), Cy3 (Rojo), Alexa 647 (Rojo Lejano)), durante 40 minutos. Los cubreobjetos fueron sumergidos brevemente en agua y situados sobre medio de montaje (Mowiol (Calbiochem), Glicerol y agua conteniendo 2,5% de DABCO (1,4-Diazabicyclo (2.2.2.) octano) (Sigma)). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal invertido *Leica TCS SP2 AOBS* y *Leica TCS SP5 AOBS* utilizando objetivos de 63X Plan Apo 1.32 NA de inmersión en aceite.

| Proteína                   | Anticuerpo   | Origen                              | Dilución | Proveedor             |
|----------------------------|--|-------------------------------------|----------|-----------------------|
| Vinculina                  | Clon h-VIN-1 (Ascitis)                               | Ratón<br>(Monoclonal)               | 1:200    | Sigma-Aldrich         |
| F-Actina                   | Alexa Fluor Faloidina546<br>Alexa Fluor Faloidina647 | <i>Amanita</i><br><i>phalloides</i> | 1:40     | Molecular Probes      |
| MT1-MMP                    | Lem -2/15 (Ascitis)                                  | Ratón<br>(Monoclonal)               | -        | Dr. Arroyo            |
| Rab11a                     | Anti-Rab11a  | Conejo<br>(Policlonal)              | 1:200    | Zymed<br>Laboratories |
| Rab8a                      | Anti-Rab8a   | Cabra<br>(policlonal)               | 1:200    | Santa Cruz            |
| Integrina $\beta 1$        | TS2/16   | Ratón<br>(monoclonal)               | -        | Dr. Sánchez<br>Madrid |
| Receptor de<br>transferina | L5.1   | Ratón<br>(Monoclonal)               | -        | Dr. Sánchez<br>Madrid |
| Colágeno<br>TipoI          | Clon Col-I (Ascitis)                                 | Ratón<br>(Monoclonal)               | 1:200    | Sigma                 |
| $\gamma$ -Tubulina         | GTU- 88 (Ascitis)                                    | Ratón<br>(monoclonal)               | 1:200    | Sigma                 |

**Tabla 2.** Resumen de los anticuerpos primarios usados en este trabajo.

### 2.1.1 Captura de Transferrina/LDL y experimentos con Ts045 VSV-G

Células embebidas en geles tridimensionales de colágeno (3D-Col I) y privadas de suero durante una hora, fueron incubadas durante una hora con Tf-Alexa 647 (20 $\mu$ g/ml) y dil-LDL (Low Density Lipoprotein conjugada con 3,3'-dioctadecilindocarbocina) (10 $\mu$ g/ml) a 37°C, para posteriormente fijar con paraformaldehído al 4% y analizar mediante microscopía confocal.

Para los experimentos de colocalización de MT1-MMP con VSV-G, las células MDA-MB-231 que habían sido previamente transfectadas MT1-MMP-mRFP y con VSV-G-YFP se embebieron en geles 3D-Col I. Ts045 VSV-G (Ts045 Vesicular

*Stomatitis Virus-Glicoprotein*) se utiliza como marcador de la ruta biosintética y esta sujeto a dos temperaturas de bloqueo, la incubación durante toda la noche a 40°C, acumula la proteína en el RE y su incubación a 20°C durante 2 horas permite la salida del RE y posterior la acumulación en la TGN. El bloqueo a 20°C se liberó incubando las células a 32°C para permitir la rápida salida del TGN con dirección a la membrana plasmática (Ang et al., 2004).

### 2.1.2. Reclutamiento de vesículas a microesferas recubiertas de matriz extracelular

Para los estudios de reclutamiento de vesículas, células MDA-MB-231 se transfectaron previamente con: (i) MT1-MMP-mRFP y Rab8WT-GFP, Rab8Q67L-GFP o Rab8ΔC-GFP; (ii) MT1-MMP-mRFP y FRNK-GFP, Rho N19-GFP, Rac N17-GFP o Cdc42N17-GFP; (iii) Rab8WT-GFP o Rab11-GFP.

Se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal y se analizó la fluorescencia de MT1-MMP, Rab8 o Rab11 en una región circundante de la microesfera y normalizando para los niveles de fluorescencia de MT1-MMP, Rab8 o Rab11 en el resto de la célula, determinado en tres regiones en zonas irrelevantes de la célula. La fluorescencia relativa en la microesfera representa la razón entre la fluorescencia de la microesfera/fluorescencia de zonas irrelevantes X 100, medido al menos en 10 microesferas por cada experimento. Para los estudios de reclutamiento, las células se incubaron con o sin 10 µg/ml del anticuerpo bloqueante anti β1- integrina Lia 1/2 o con un anticuerpo control BerEp4 10 µg/ml (antígeno epitelial humano).

### 2.1.3. Ensayos de degradación de colágeno

Las células se cultivaron sobre cubres recubiertos con colágeno purificado de cola de rata, (Roche Diagnostics) durante 48 horas para permitir la degradación de la matriz de colágeno. Posteriormente se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo contra colágeno tipo I (Sigma).

## 2.2 ESTUDIOS DE MICROSCOPIA EN CÉLULAS VIVA

Para realizar los estudios en célula viva las células se crecieron en diferentes cámaras, MATTEK (multipocillo o de un solo pocillo) o LAB-TEK (multipocillo). Los microscopios utilizados para estos ensayos (*Leica TCS SP2 AOBS*, *Leica TCS SP5 AOBS* y *Leica DMI6000*) disponían de un incubador de temperatura y CO<sub>2</sub> para permitir mantener una temperatura de 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante todo el experimento.

### 2.2.1. Estudios de tráfico vesicular

Los estudios de tráfico de vesículas se llevaron a cabo en células MDA-MB-231 embebidas en geles tridimensionales de colágeno y que habían sido previamente (24 horas) transfectadas con MT1-MMP-GFP o MT1-MMP-mRFP/Rab8-GFP y. Los experimentos se llevaron a cabo usando un microscopio *Leica TSC SP2 AOBS* dotado de un objetivo de 63X Plan Apo 1.32 NA de inmersión en aceite (Leica, Mannheim, Alemania). El software LCS (Leica confocal Software) se utilizó para la adquisición de imágenes.

Asimismo, se utilizó un microscopio confocal *Leica TCS SP5 AOBS* con un escáner resonante de alta velocidad para los estudio de la dinámica vesicular de MT1-MMP-GFP hacia estructuras invasivas.

Para estudiar el tráfico de vesículas de MT1-MMP hacia microesferas recubiertas de colágeno, células MDA-MB-231 que expresaban MT1-MMP-GFP se incubaron durante 1 hora con microesferas previamente recubiertas de colágeno. Posteriormente se adquirieron imágenes cada 16 segundos en un microscopio Leica TCS SP2 con un objetivo de 63X Plan Apo 1.32 NA de inmersión en aceite (Leica, Mannheim, Alemania).

### 2.2.2 Experimentos de fotoblanqueamiento

Una combinación de las técnicas de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) y FLIP (Flourescence Lose In Photobleaching) se llevo a cabo en un microscopio *Leica TCS SP2 AOBS* usando el software “Leica Confocal Software”.

Células que expresaban MT1-MMP-GFP embebidas en matrices de 3D-Col I se sometieron al siguiente protocolo de fotoblanqueamiento: 1) Pre-blanqueamiento (obtención de 3 imágenes excitando con la línea 488 del láser de Argón, con el AOTF al 20% de intensidad de toma de imágenes) 2) Blanqueamiento y adquisición en dos regiones diferentes ( zona de membrana y la región submembrana adyacente) usando una potencia de excitación, de la línea 488 del láser de Argón, del 100% AOTF en ambas regiones y del 20% AOTF para la toma de imágenes en el resto del campo 3) Post-blanqueamiento. Durante el postblanqueamiento, la región de FRAP se excitó con una intensidad de la línea de láser de Argón 488 del 20 % AOTF para la toma de imágenes, mientras que la región de FLIP se mantuvo en condiciones de blanqueo continuo, es decir, excitando con un 100% de AOTF.

Para procesar los datos obtenidos de los experimentos de FRAP-FLIP se realizaron 3 correcciones: 1) Substracción de ruido de fondo en la imagen, 2) corrección para el fotoblanqueo debido a la adquisición y 3) la normalización. Para la corrección del fotoblanqueo cada punto se multiplico adquirido en la region de FRAP por el cocinete  $F_{precell}/F_{infcell}$ , donde  $F_{precell}$  es la intensidad de toda la célula en el pre-blanqueamiento, y  $F_{infcell}$  es la intensidad en el fotoblanqueamiento (en la célula entera menos la región de quemado) en cada punto. Se uso la normalización de Siggia (Siggia et al., 2000) donde cada valor obtenido en la región de análisis durante el experimento es dividido por el primer valor adquirido en el experimento, que es el valor de esa región en el preblanqueamiento.

### 3. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN

#### 3.1 Ensayos de invasión y quimiotaxis

Los ensayos de invasión se llevaron a cabo usando cámaras de Boyden modificadas, cámaras “Transwell”, de 8µm de tamaño de poro (Corning Costar Cor.). La parte inferior de la membrana porosa de la cámara fue recubierta con 3mg/ml Col I para los estudios de invasión y con 20µg/ml de FN para los estudios de quimiotaxis. Las células ( $5 \times 10^4$  células por pocillo) se depositaron en la parte superior de la cámara y se mantuvieron durante 48h a 37°C para permitir su trans migración hacia la parte inferior que contenía medio con el 10% FBS en los estudios de invasión, o bien medio sin suero con 10µM de EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor) (RD System) para los estudios de

quimiotaxis. Posteriormente se contaron las células de la parte inferior y superior de la membrana en 4 campos elegidos al azar. Las células invasivas (ensayos de invasión) o células migrantes (ensayos de quimiotaxis) fueron cuantificadas como el porcentaje de células que han atravesado la membrana con respecto del total de células contabilizadas en la parte superior e inferior.

En los ensayos de invasión las células se mantuvieron durante 48 horas a 37°C para permitir su transmigración hacia la parte inferior de la membrana en presencia de un isotipo control IgG (10 µg/ml) o en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-MT1-MMP (10µg/ml) (Lem-2/15) (Galvez et al., 2002).

### 3.2. Ensayos migración aleatoria sobre matrices 2D

Las células fueron cultivadas sobre superficies (MATTEK multipocillo) recubiertas con FN (20 µg/ml) a igual dilución en las diferentes condiciones. Se eligieron 5 campos al azar, donde se obtuvieron imágenes de fluorescencia cada 10 minutos durante 16 horas, utilizando un microscopio *Leica DMI6000* equipado con una cámara CCD (Charge-Coupled Device) DFC350FX (Leica, Mannheim, Germany) y con un objetivo de 20X HC-Plan APO 0.7 N.A. Las trayectorias individuales de cada célula, en cada una de las condiciones se analizaron utilizando el software Imaris (Bitplane AG, Zurich, Suiza).

### 3.3. Ensayos de cierre de herida

Las células fueron crecidas hasta confluencia en cámaras LAB-TEK de 4 pocillos. En cada monocapa se realizaron diversas heridas rayando con una punta de pipeta de 0,1-2µM. El cierre de heridas se monitorizo, mediante la adquisición de imágenes cada 15 minutos durante 16 horas, en un microscopio *Leica DMI6000* equipado con una cámara CCD DFC350FX (Leica, Mannheim, Germany), con un incubador de temperatura y CO<sub>2</sub> y con un objetivo HCPL Fluorar 5X/0.15 NA. La superficie de la herida cubierta por la monocapa de células fue calculada mediante el posterior análisis de las imágenes obtenidas utilizando el software LAS AF (Leica). El porcentaje de cierre se cuantificó como el área cubierta cada hora referida al área total de la herida.

## 4. DETERMINACIÓN DE LA POLARIZACIÓN CELULAR

Para estudiar la polarización celular estudiamos la polarización del MTOC (Centro organizador de Microtúbulos). Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de 12mm y una vez alcanzada la confluencia las monocapas se rayaron con una punta de pipeta. 2, 4, 6 y 8 horas después, fueron fijadas. Después se realizó la inmunofluorescencia marcando para  $\gamma$ -tubulina. Para realizar un análisis cuantitativo las células de la primera fila fueron segmentadas en dos regiones. Una entre el núcleo y la superficie de la monocapa, y el resto de la célula. Las células que presentaban el MTOC localizado en la primera región, donde se sitúa la herida, se contabilizaron como positivas. (Fig. 1)



**Figura 1.** Diagrama del criterio usado para determinar la orientación del MTOC.

## 5. SILENCIAMIENTO GÉNICO

Para el diseño de shRNAs para los genes Rab8 y Rab11 se utilizaron los algoritmos disponibles en diferentes webs <http://side.bioinfo.ochoa.fib.es/> y [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com). Se utilizaron 3 secuencias diferentes para silenciar cada uno de estos genes. Para silenciar Rab8 se eligieron las siguientes secuencias: Rab8 (1): 5'-GAGAATTAAACTGCAGATA-3', Rab8 (2): 5'-GGAAGTGGATTTCGCAACATTG-3' y Rab8 (3): 5'-GCTCGATGGCAAGAGAATTAA-30), y para silenciar Rab11: Rab11 (1): 5'-AAGAGCACCATTGGAGTAGAGTT-3', Rab11 (2): 5'-GTACGACTACCTCTTTAAA-3' y Rab11 (3): 5'-GCAACAATGTGGTTCCTATTC-3'.

## 5.1 Transducción retroviral para la generación de líneas estables silenciadas para Rab8 y Rab11

Los shRNAs se clonaron dentro del vector retroviral MSCV Pig, una versión modificada de MSCV-Puro (Clontech), que contiene GFP como reportero de la expresión del shRNA. La transducción retroviral se llevo a cabo usando retrovirus de alto título generados por la transfección transitoria de la línea celular empaquetadora 293T. Para generar las partículas virales,  $5 \times 10^6$  células 293T se transfectaron con 10  $\mu$ g del plásmido que expresa las proteínas gag, pol, env amfotrófico (denominado pCL-Ampho) más 10  $\mu$ g de los plásmidos que contenían los diferentes shRNAs para Rab8 y Rab11.

Veinticuatro horas después, se realizo la infección en células receptoras (MDA-MB-231) que habían sido previamente sembradas. Para la infección se recogió el sobrenadante de las células empaquetadoras, se filtro a través de un filtro de 45 $\mu$ M y se reemplazo el medio de las células receptoras por el sobrenadante con los retrovirus de las células empaquetadoras. A este sobrenadante viral se le añadió polibreno para aumentar la eficiencia de la infección. Tras realizar 3 infecciones, las células fueron seleccionadas en presencia de puromicina (0,5 $\mu$ g/ml) durante 5 días y aquellas que expresaban GFP se separaron mediante citometria de flujo para obtener líneas estables que expresaban establemente los diferentes shRNAs.

Para los experimentos de rescate del fenotipo inducido por shRNARab8 (1), 4 mutaciones silenciosas se introdujeron en la secuencia diana del shRNA (1) de Rab8 (nucleótidos 165-183). La secuencia final mutada de Rab8 (AGGATTAAGTTGCAAATA) se obtuvo por PCR y se subclono dentro del vector mRFP. El plásmido Rab8-Mut-mRFP se trasfectó en las células silenciadas para Rab8 con el shRNA Rab8 (1).

## 5.2. Silenciamiento transitorio de Rab8

El shRNA se clonó en el vector pEntry/D-TOPO y posteriormente se transfirió, usando la tecnología Gateway (Invitrogen), al vector de expresión de mamíferos pA90.GFP-Neo.GT que lleva como reportero de expresión la proteína GFP. La secuencia que se diseño para el RNA fue 5'-GAGAATTAACTGCAGATA-3'. Estos



vectores, con shRNA y el control pA90 se transfectaron en células MDA-MB-231 según protocolo descrito.

## 6. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE SRC QUINASA, MEK, P38, JNK Y PI3K

El inhibidor de Src (PP2) y (SU-6656), así como su control negativo (PP3), (Calbiochem), de MEK (PD-98059) (Calbiochem), de p38 (SB-203580) (Calbiochem), de JNK (SP-600125) (Calbiochem), y de PI3K (Ly-294002) (Calbiochem), fueron disueltos en DMSO y almacenados a 4°C o -20°C (SU-6656, PD-98059, SB-203580, SP-600125). Las concentraciones con las células de cada reactivo están especificadas en los pies de figura de cada experimento.

## 7. ENSAYO DE DESENSAMBLAJE DE ADHESIONES FOCALES

Células MDA-MB-231 silenciadas para Rab8 o células control se cultivaron sobre cubres de 12 mm recubiertos de FN. Se trataron con 10µM de nocodazol durante 4h para producir la despolimerización de los microtúbulos. Después, se retiró la droga para permitir la repolimerización de los microtúbulos. Las células se fijaron y permeabilizaron a los diferentes tiempos indicados, permitiendo la repolimerización de los microtúbulos. Posteriormente las células se analizaron por técnicas de inmunofluorescencia.

## 8. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

### 9.1 Análisis de proteínas

Los extractos celulares se prepararon lisando las células en tampón de lisis (50mM Tris pH 7,4; 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 2mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ), suplementado con inhibidores de proteasas (cocktail inhibidores de proteasas, Roche). La cantidad de proteína presente en cada muestra se midió usando el “BioRad DC Protein Assay Kit”. Un total de entre 30 a 50 µg de proteína se resolvió en geles SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis) preparados al

15% que posteriormente, fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS con Tween 0,2% y finalmente la detección de proteína se realizó usando el anticuerpo primario correspondiente (Ver tabla 3). El análisis por fluorescencia se realizó revelando con anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos Alexa 680. La cuantificación de la fluorescencia se llevó a cabo en el sistema Odyssey Infrared.

| Proteína          | Anticuerpo  | Origen              | Dilución | Proveedor             |
|-------------------|-------------|---------------------|----------|-----------------------|
| Rab8a             | Anti-Rab8a  | Cabra (Policlonal)  | 1:200    | Santa Cruz            |
| Rab11a            | Anti-Rab11a | Conejo (Policlonal) | 1:500    | Zymed<br>Laboratories |
| $\alpha$ -Tubulin | DM 1a       | Ratón (Monoclonal)  | 1:10000  | Sigma                 |
| Rac1              | UBI#05-389  | Ratón               | 1:1000   | Upstate               |

**Tabla3.** Resumen de los anticuerpos utilizados en Western Blott.

## 9.2 Ensayos de “pull-down”

Para los ensayos de pull-down de Rac, células HT1080 que expresaban GFP o Rab8Q67L-GFP se plaquearon sobre FN durante 4h, para después deprivarlas de suero durante una hora y finalmente estimularlas con 50nM EGF durante 30 minutos adicionales. Las células se lisaron en tampón de lisis (NP40 0,5%, Tris/Cl Ph=7 50mM, Glycerol 10%, NaCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Leupeptina/Aprotinina 10 µg/µl, PMSF 1mM, EGTA 1mM, GST-PBD 20 µg por muestra). Los lisados se transfirieron a tubos que se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 minutos a 4°C. Un volumen equivalente de cada muestra se transfirió a los tubos con microesferas de Glutathion Sepharosa, que se incubaron otros 30 minutos en hielo. Después se lavaron 3 veces con 50mM Tris 7.2, 150mM NaCl, 1% TritonX-100 e inhibidores de proteasas. Luego las muestras se resolvieron en geles al 13% SDS-PAGE y se revelaron con los anticuerpos primarios y secundario (Anti-ratón HRP (Horseadish peroxidase)) correspondientes.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores numéricos representan la media  $\pm$  el error estándar. La significancia estadística comparando diferentes condiciones se analizaron usando el prueba T de Student.  $P < 0,05$  se tomo como limite de significancia estadística (\*<sup>#</sup>  $P < 0,05$ ; \*\*<sup>###</sup>  $P < 0,01$ ; \*\*\*<sup>####</sup>  $P < 0,001$ ).

## ***IV. Resultados***

Cuando las células migran a través de los tejidos, la matriz extracelular genera una serie de barreras que impiden el avance de las mismas. Los geles tridimensionales de colágeno tipo I (3D-Col I), que mimetizan el entorno fisiológico de la célula, representan un modelo para estudiar la invasión celular, ya que las estrategias de migración celular son muy parecidas a las que se producen cuando la célula se encuentra invadiendo un tejido. Es en este contexto tridimensional, donde el procesamiento de la matriz extracelular juega un papel fundamental para permitir a las células migrar, por lo que la utilización de este modelo de invasión es clave para el estudio de metaloproteinasas, como MT1-MMP, proteínasa clave en la degradación de matriz. Con el fin de establecer un modelo que nos permita estudiar la invasión celular y el papel de MT1-MMP en un contexto más fisiológico, se desarrolló un modelo de células embebidas en 3D-Col I, donde se estudió la localización y dinámica de dicha enzima mediante técnicas de imagen.

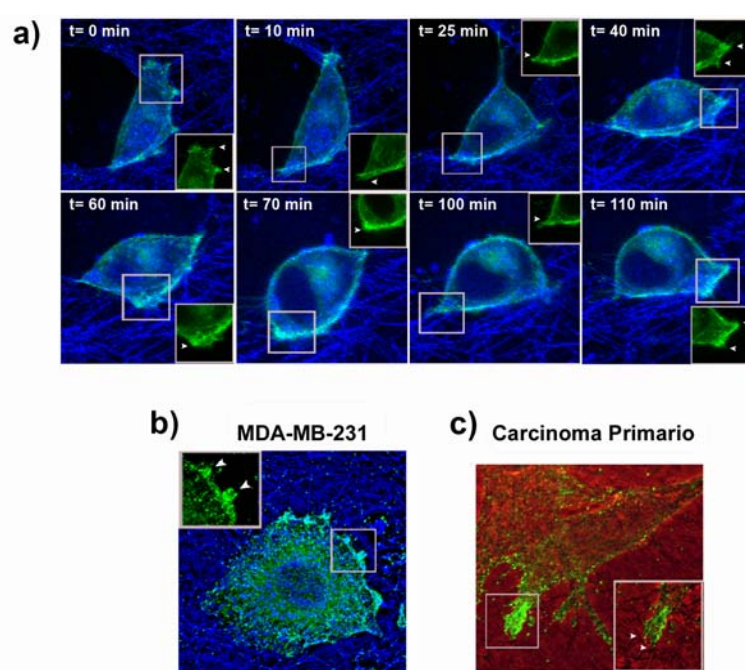
A continuación, describiremos los resultados que corresponden con el primer objetivo planteado: estudiar la regulación del transporte de MT1-MMP hacia las estructuras invasivas.

## 1. MT1-MMP SE REDISTRIBUYE A LAS ESTRUCTURAS INVASIVAS DURANTE LA INVASIÓN TUMORAL

Se transfectaron células MDA-MB-231 con MT1-MMP-GFP y se embebieron en geles tridimensionales de colágeno (3D-Col I). Mediante microscopía confocal de célula viva se estudió la actividad y dinámica de MT1-MMP durante la invasión tumoral. Como se observa en la figura 1a, las imágenes de fluorescencia (verde) y reflexión (azul) muestran la distribución de MT1-MMP en zonas de adhesión a las fibras de colágeno y en la membrana plasmática, así como la subsiguiente degradación de las fibras durante el avance de la célula (Fig. 1a, y Video 1, ver Anexo II para pies de figura de los videos).

La distribución de MT1-MMP endógeno se estudió, mediante el marcaje por inmunofluorescencia, tanto en células de la línea transformada de carcinoma de mama MDA-MB-231, como en células primarias de carcinoma endometrial. El marcaje se realizó con un anticuerpo específico anti-MT1-MMP (Lem-2/15), lo que reveló la localización de esta metaloproteínasa en las zonas de protrusión de membrana en contacto con la matriz de colágeno (Fig. 1b y 1c).

Se usaron únicamente células que expresaban altos niveles de MT1-MMP-GFP para monitorizar la actividad de MT1-MMP durante la invasión tumoral, ya que producen una gran destrucción de la matriz extracelular, mostrando claramente que MT1-MMP-GFP mantiene su actividad de degradación proteolítica. Sin embargo, el resto de experimentos se realizaron con células que expresaban niveles reducidos de MT1-MMP-GFP, situación que se asemeja más a las condiciones fisiológicas. Esto se llevo a cabo eligiendo células con poca intensidad de emisión de fluorescencia de GFP, que producían una degradación puntual, no masiva, de las fibras de colágeno durante el proceso invasivo.



**Figura 1. MT1-MMP se acumula en los sitios de degradación de colágeno durante la invasión de matrices tridimensionales (3D-Col I). a)** Superposición de MT1-MMP-GFP (verde) y la reflexión de las fibras de colágeno (azul) obtenidas a los tiempos indicados durante un experimento de microscopía de célula viva. (Video 1). **b) y c)** Localización de MT1-MMP endógeno en células MDA-MB-231 y en células primarias de carcinoma endometrial embebidas en 3D-Col I.

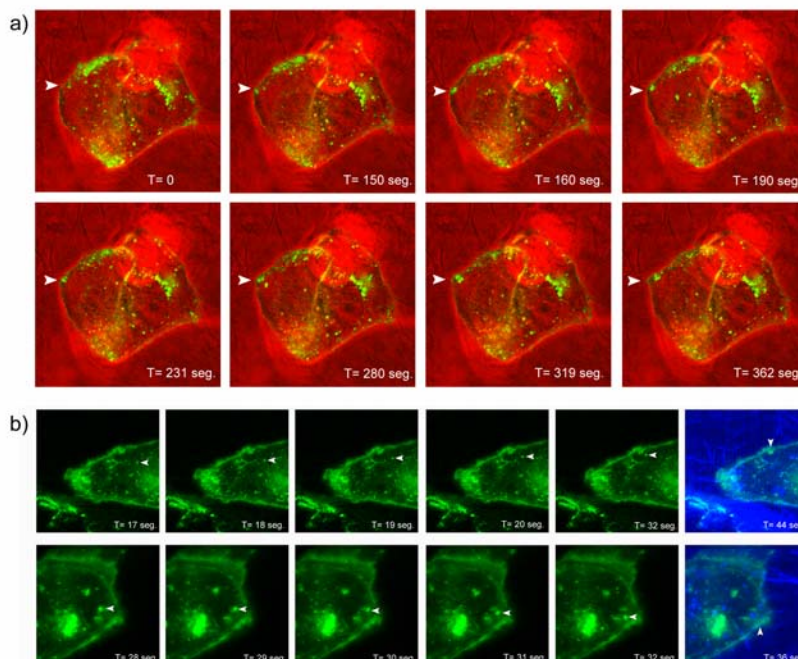
**b)** Superposición de fluorescencia de MT1-MMP (verde) y las fibras de colágeno (azul) obtenidas por reflexión. **c)** Superposición de contraste de fases e imagen de fluorescencia. Los recuadros dentro de las imágenes muestran los sitios de anclaje a fibras de colágeno donde se acumula MT1-MMP-GFP o MT1-MMP (puntas de flecha).

## 2. EL TRÁFICO INTRACELULAR COMO RESPONSABLE DEL RECLUTAMIENTO DE MT1-MMP A PUNTOS DE ANCLAJE AL COLÁGENO

### 2.1 Microscopía de célula viva para visualizar el tráfico intracelular de MT1-MMP

La localización de MT1-MMP en estructuras invasivas ya ha sido descrita previamente (Lehti et al., 2000; Mori et al., 2002; Nakahara et al., 1997), sin embargo, los mecanismos responsables de esta distribución en la superficie celular no han sido

establecidos. Con el fin de estudiar la localización subcelular de MT1-MMP se embebieron células MDA-MB-231, que expresaban MT1-MMP-GFP en geles de colágeno. Como se puede observar en la figura 2a, MT1-MMP se localiza en compartimentos submembranosos de vesículas que se acumulan en áreas subyacentes a estas estructuras invasivas. Se obtuvo una clara evidencia del reclutamiento de MT1-MMP hacia estas estructuras cuando se monitorizó la formación de un nuevo evento protrusivo, como podemos observar en las imágenes tomadas a diferentes tiempos que se presentan en la figura 2a y en el Video 2. El anclaje de la célula a las fibras de colágeno se ve acompañado del reclutamiento de vesículas de MT1-MMP hacia este área submembranosa, seguido de la acumulación local de MT1-MMP en la zona protrusiva de membrana. La visualización de trayectorias individuales de vesículas positivas para MT1-MMP-GFP mediante el uso de microscopía confocal de alta velocidad reveló una elevada complejidad de este tráfico vesicular. Estos experimentos nos permitieron observar un transporte de vesículas (señaladas con flechas) desde estos compartimentos internos hasta la zona de polarización (Fig. 2b, y Videos 3 y 4).



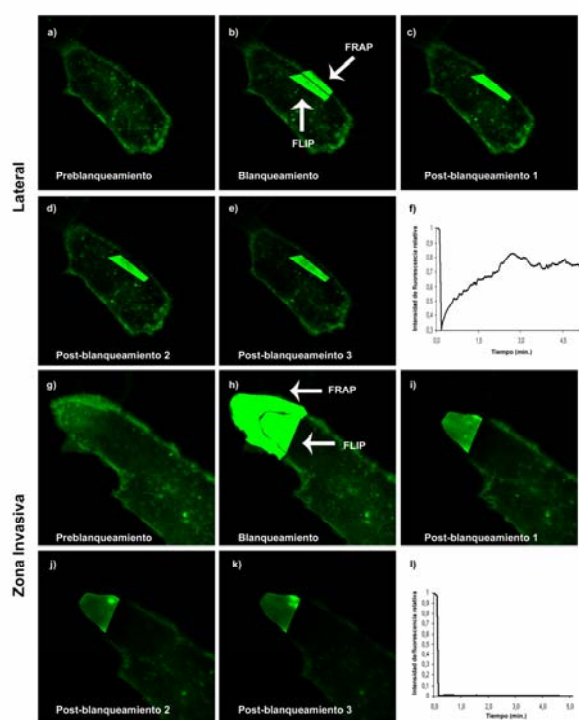
**Figura 2. Reclutamiento de vesículas de MT1-MMP hacia los puntos de contacto con la matriz de colágeno en células MDA-MB-231. a)** Microscopía confocal *in vivo* de células MDA-MB-231 transfectadas con MT1-MMP-GFP. La superposición de la fluorescencia (verde) con el contraste de fases (rojo) muestra la morfología celular y la distribución de las fibras de colágeno, adquiridas a diferentes tiempos. Las puntas de flecha muestran un nuevo contacto entre la membrana celular y la red de fibras de colágeno, donde se observa el sucesivo reclutamiento de vesículas.

**b)** Reclutamiento de vesículas de MT1-MMP hacia los sitios de contacto con el colágeno usando microscopía de alta velocidad. Las imágenes muestran la localización de MT1-MMP-GFP (verde) y la superposición con las fibras de colágeno (azul) adquiridas en diferentes planos y en diferentes tiempos (las imágenes se tomaron cada 1s, superior; cada 900 ms, inferior).



## 2.2. Experimentos de FRAP-FLIP

Se ha propuesto que el transporte de MT1-MMP hacia las estructuras invasivas está mediado por CD44, que transportaría la metaloproteinasa por la membrana (Kajita et al., 2001; Lehti et al., 2000; Mori et al., 2002). Sin embargo, nuestros experimentos de microscopía realizados en célula viva, sugieren que el tráfico intracelular de vesículas es el responsable de la acumulación de MT1-MMP en las estructuras invasivas (Fig. 2). Llevamos a cabo experimentos de FRAP (recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento) con el fin de desvelar la dependencia del aporte de las vesículas de los compartimentos intracelulares, a la vez que realizábamos FLIP (pérdida de fluorescencia durante el fotoblanqueamiento). Fotoblanqueamos la zona de la membrana plasmática anclada a colágeno, estudiando posteriormente la recuperación de la fluorescencia en esta región denominada FRAP, mientras realizábamos fotoblanqueamiento continuo en el compartimento submembranoso adyacente o región FLIP (Fig. 3). A diferencia de las zonas laterales de la célula, donde se pudo observar recuperación de la fluorescencia en la membrana plasmática, en las estructuras invasivas no se producía esta recuperación (Fig. 3g-k). Demostrando que la difusión de MT1-MMP de membrana, hacia las zonas invasivas, se encuentra comprometida y el tráfico intracelular es el responsable de la acumulación de la metaloproteinasa en estas estructuras.



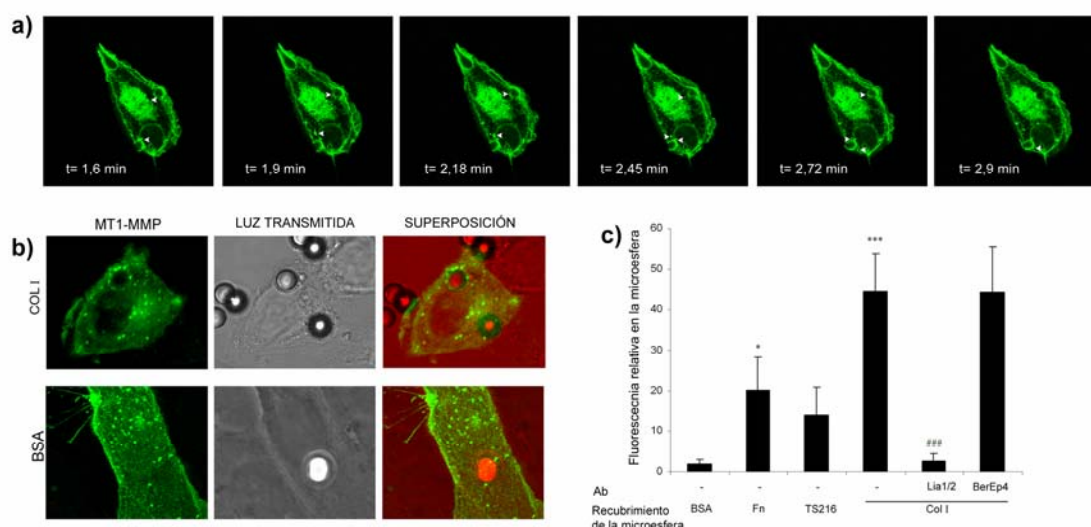
**Figura 3. Experimentos de FRAP/FLIP en células que expresaban MT1-MMP-GFP revelan como el tráfico vesicular a las zonas invasivas es el responsable de acumulación de MT1-MMP en estas zonas.** Las imágenes muestran el preblanqueamiento, blanqueamiento y postblanqueamiento en la membrana plasmática (región FRAP) durante la continua eliminación de fluorescencia en los compartimentos submembranosos (región FLIP) en una zona lateral de la célula (g-K) o en el frente invasivo (G-K). La cuantificación de la recuperación de fluorescencia en la región de FRAP en la zona lateral e invasiva se representa en las gráficas (f y l).



### 3. IMPLICACIÓN DE LA ADHESIÓN VÍA INTEGRINAS EN EL RECLUTAMIENTO DE MT1-MMP

#### 3.1. Papel de la matriz extracelular

Con el fin de estudiar el papel de la matriz extracelular en el tráfico de MT1-MMP realizamos experimentos con células MDA-MB-231 transfectadas con MT1-MMP-GFP; estas células se incubaron con microesferas recubiertas con diferentes componentes de matriz extracelular. Este ensayo de reclutamiento de MT1-MMP a microesferas mimetiza la generación de un nuevo punto de unión de la célula y la matriz. En experimentos de microscopía en célula viva (Fig. 4a y Video 5) se pudo detectar un aumento de fluorescencia de MT1-MMP en la zona adyacente a la microesfera de colágeno. Este reclutamiento, sin embargo, no se detectó en células incubadas con microesferas recubiertas de BSA (Albúmina de suero bovino) utilizadas como control. En experimentos de microscopía confocal de célula viva se pudo observar un reclutamiento activo de vesículas hacia la zona de contacto con la microesfera (Fig. 4a y Video 5). Para indagar en las claves que inducen este reclutamiento se incubaron microesferas recubiertas de BSA, fibronectina (FN), anti- $\beta 1$  Ab (TS2/16) o colágeno tipo I (Col I), con células MDA-MB-231 que expresaban MT1-MMP-GFP. Posteriormente, las células se fijaron y se analizaron mediante microscopía confocal, como se describe en la sección de materiales y métodos. El análisis cuantitativo demostró que el colágeno, la FN o los anticuerpos que promueven la agrupación de la integrina  $\beta 1$  (TS/216) inducían el reclutamiento de vesículas de MT1-MMP hacia la microesfera. Además, el reclutamiento de MT1-MMP inducido por colágeno se pudo bloquear incubando previamente las células con anticuerpos inhibidores de la función de integrina  $\beta 1$  (Lia1/2) (Fig. 4c), no así cuando las células se incuban con un anticuerpo control (BerEp4). Estos resultados demuestran que el reclutamiento de vesículas hacia las zonas en contacto con la matriz está mediado por los procesos de adhesión vía integrinas.



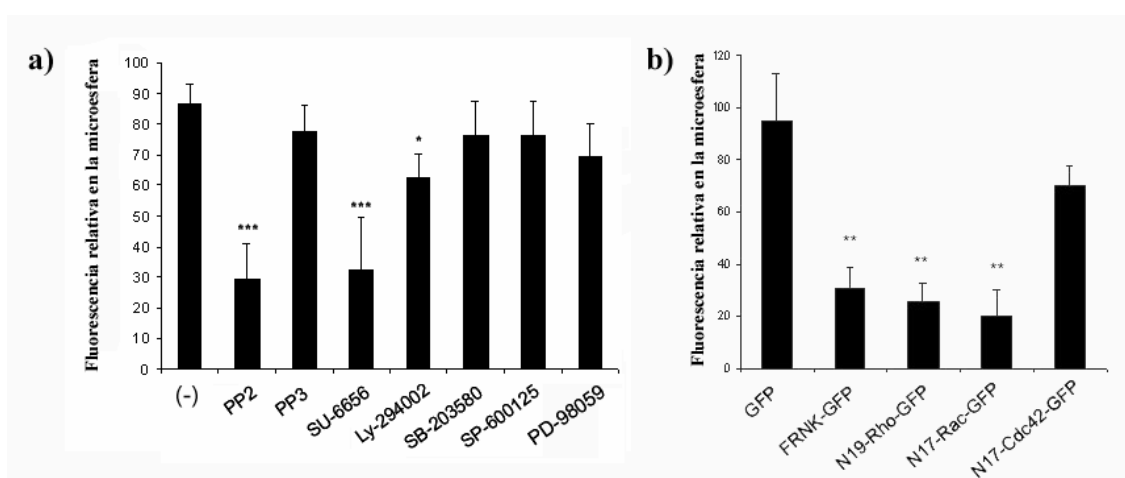
**Figura 4. Reclutamiento de MT1-MMP a microsferas recubiertas con colágeno.** **a)** Microesferas recubiertas de colágeno se incubaron con células MDA-MB-231 que expresaban MT1-MMP-GFP. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia en 4 planos de la célula cada 16 segundos usando microscopía confocal en célula viva. La proyección máxima de las imágenes correspondientes a los diferentes planos, obtenidos a los tiempos indicados, muestra el reclutamiento de las vesículas hacia la microesfera. Las puntas de flecha muestran las vesículas siendo reclutadas hacia la microesfera. **b)** Células MDA-MB-231 que expresan MT1-MMP-GFP, se crecieron sobre cristal, y se incubaron con microsferas recubiertas de Col I o BSA durante 1h, para posteriormente fijar y analizar mediante microscopía confocal. Se muestran imágenes de fluorescencia, transmisión de contraste de fases y la superposición de ambas. **c)** Cuantificación del reclutamiento de vesículas de MT1-MMP-GFP a microsferas recubiertas de diferentes componentes de matriz extracelular. La comparativa estadística se refiere a los diferentes recubrimientos de la microesfera con el control BSA (\*), o al tratamiento con el anticuerpo anti-MT1-MMP comparado con el control BSA (#).

### 3.2. Rutas de señalización implicación en el transporte de MT1-MMP

Con el fin de explorar las rutas de señalización implicadas en la movilización de MT1-MMP hacia estructuras invasivas realizamos experimentos de reclutamiento de MT1-MMP hacia microsferas recubiertas de Col I. Utilizamos células MDA-MB-231 que expresaban MT1-MMP-GFP tratadas previamente con inhibidores específicos para diferentes quinasas. El bloqueo de la actividad de Src, tanto con el inhibidor PP2, como con el inhibidor SU-6656, así como la inhibición de PI3K con el inhibidor Ly-294002, produjeron una notable disminución en el reclutamiento de MT1-MMP hacia microsferas de colágeno (Fig. 5a). Este reclutamiento, sin embargo, no fue bloqueado con inhibidores de la ruta de las MAP quinasas: MEK, p38 y JNK (PD-98059, SB-203580, SP-600125, respectivamente), descartando su posible implicación en el tráfico de MT1-MMP.

Las GTPasas de la familia Rho están implicadas en la polarización celular (Ridley, 2001). Los mutantes inactivos de estas GTPasas se han utilizado como

herramienta para bloquear la actividad de estas GTPasas. Estos mutantes poseen una mutación puntual que les impide interactuar con efectores una vez unidos a GTP. Se unen a GEFs de la célula y forman un complejo inactivo, secuestrando estos GEFs, lo que impide la activación de las GTPasas endógenas (Feig, 1999). Se transfectaron células que expresaban MT1-MMP-mRFP con los dominantes negativos de Rho, Rac, Cdc42 o con el mutante inactivo de FAK (FRNK, *F*AK *R*elated *N*on-*K*inase *D*omain). El reclutamiento de MT1-MMP hacia microesferas recubiertas de Col I se bloqueó con los dominantes negativos de Rho, Rac y FAK, pero no de Cdc42 (Fig. 5b). Estos datos revelan la implicación del módulo FAK/Src, así como de las GTPasas Rho y Rac, en el tráfico polarizado de MT1-MMP hacia estructuras invasivas.



**Figura 5. Rutas de señalización implicadas en el tráfico de MT1-MMP inducido por la adhesión a microesferas de colágeno.** **a)** Células transfectadas con MT1-MMP-GFP fueron previamente tratadas o no con inhibidores de Src: 1  $\mu$ M SU-6656, 5  $\mu$ M PP2, o 5  $\mu$ M del control inactivo, PP3; inhibidores de MAPK: 25  $\mu$ M PD-98059, 10  $\mu$ M de SB-203580, 20  $\mu$ M SP-600125, específicos para MEK, p38 y JNK respectivamente, y Ly-294002 (30  $\mu$ M) como inhibidor de PI3K. **b)** Células MDA-MB-231 se transfectaron conjuntamente con MT1-MMP-mRFP y GFP, o con los dominantes negativos de FAK, Rho, Rac, Cdc42 unidos a GFP (FRNK-GFP, Rho N19-GFP, Rac N17-GFP o Cdc42 N17-GFP respectivamente). Las células se incubaron con microesferas recubiertas de colágeno, la fluorescencia relativa alrededor de la microesfera se normalizó para el fondo en 10-15 células de 3 experimentos diferentes.

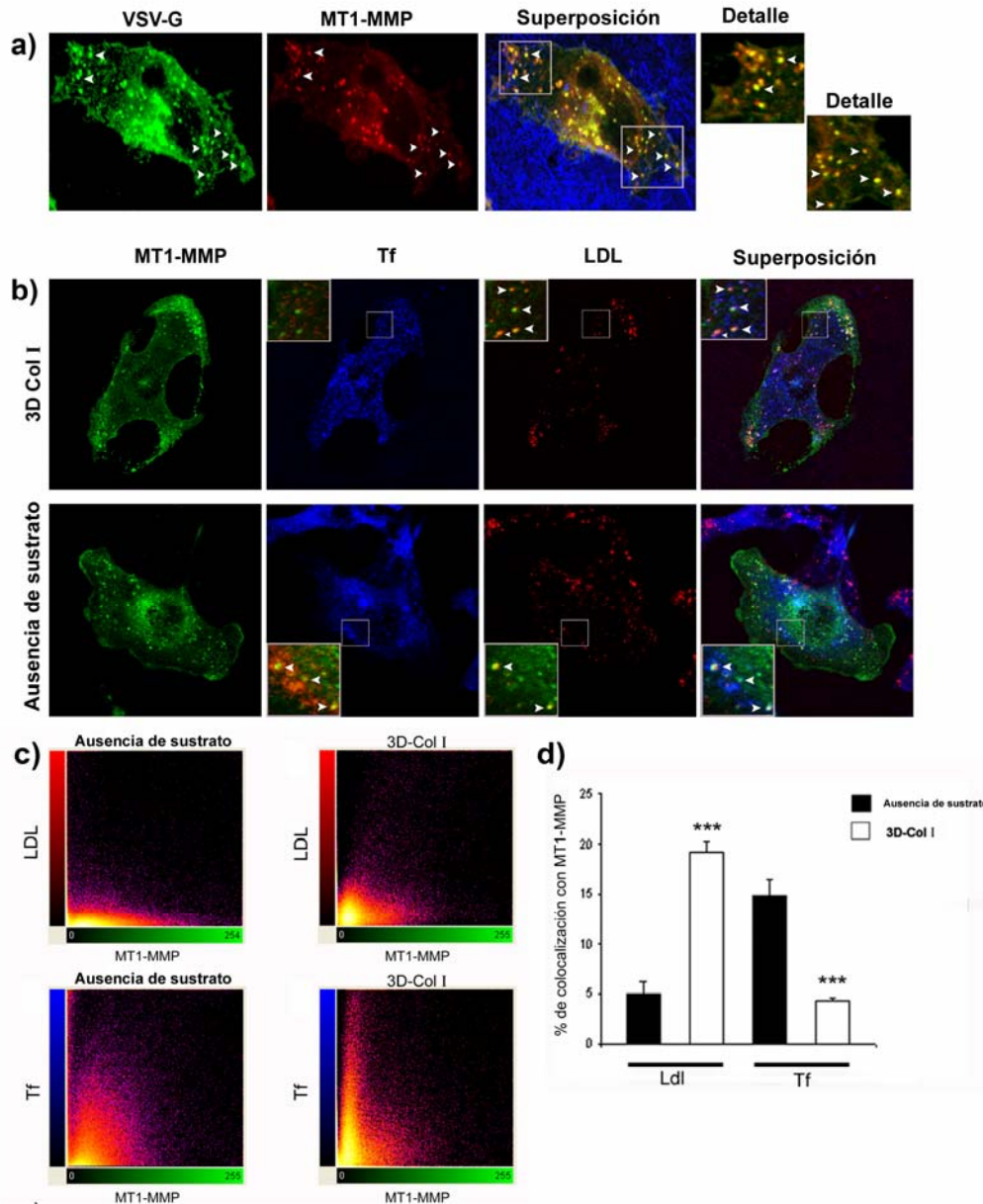
#### 4. RUTA DE TRÁFICO IMPLICADA EN EL TRANSPORTE DE VESÍCULAS DE MT1-MMP EN CÉLULAS INVASIVAS

Para explorar la implicación de la ruta biosintética en la exocitosis de MT1-MMP a la membrana plasmática se llevaron a cabo estudios de co-localización, utilizando un marcador clásico de esta ruta: la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G. Células MDA-MB-231 transfectadas con MT1-MMP-mRFP y VSV-G-YFP se embebieron en 3D-Col I, y se incubaron a 40°C durante toda la noche, para permitir la acumulación de VSV-G en el retículo endoplásmico (Ang et al., 2003).

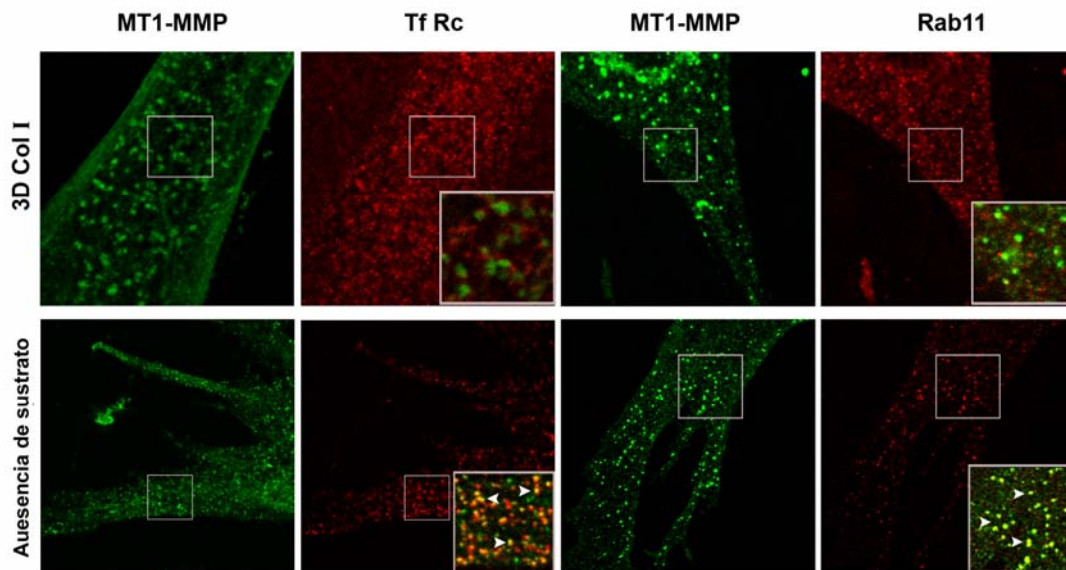
Después, se mantuvieron a 20°C durante dos horas con el fin de acumular la proteína en la TGN. Finalmente, se transfirieron a una temperatura de 32°C que permite la salida de VSV-G desde el TGN hacia la membrana plásmatica. Los estudios de microscopía confocal mostraron una fuerte co-localización de VSV-G con MT1-MMP en vesículas que se translocan hacia zonas invasivas (Fig. 6a). Estos resultados sugieren que el tráfico biosintético exocítico está implicado en el reclutamiento de MT1-MMP hacia dichas estructuras invasivas.

El transporte biosintético de proteínas hacia la membrana plasmática ocurre a través de los endosomas de reciclaje (Ang et al., 2004; Futter et al., 1995; Leitingner et al., 1995; Lock and Stow, 2005). Además, la ruta de reciclaje se ha propuesto como un mecanismo para el reclutamiento de MT1-MMP hacia el frente de avance durante la migración celular (Remacle et al., 2003; Wang et al., 2004b). Estos datos nos hacían suponer la implicación de la ruta de reciclaje en el reclutamiento de MT1-MMP a la membrana plasmática. Células transfectadas con MT1-MMP-GFP se incubaron con Transferrina-Alexa647 (Tf-Alexa647) y con LDL-594 (Low Density Lipoprotein) durante 1h a 37°C para permitir su internalización. La transferrina (Tf) se internaliza junto con el LDL por los endosomas tempranos, posteriormente el LDL sigue la ruta de degradación lisosomal, mientras que la transferrina es reciclada a la membrana plasmática. De esta forma, el marcaje con Tf y LDL permitió discriminar los compartimentos de reciclaje y degradación respectivamente. La ruta de tráfico implicada en el transporte de MT1-MMP a estructuras invasivas se analizó mediante ensayos de co-localización de estos marcadores con MT1-MMP (Fig. 6b). En células MDA-MB-231 embebidas en 3D-Col I MT1-MMP no se observó co-localización con Tf, aunque sí un elevado nivel de co-localización con LDL (Fig. 6b). Estos datos resultan llamativos, ya que estudios previos habían demostrado la presencia de MT1-MMP en compartimentos de reciclaje (Remacle et al., 2003; Wang et al., 2004b). Por ello, estudiamos células mantenidas en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en dichos estudios (en ausencia de sustrato). Estos estudios confirmaron los datos previos, indicando que MT1-MMP se aloja en los compartimentos de reciclaje en células cultivadas en ausencia de sustrato (Fig. 6). Los estudios de co-localización con los marcadores de las diferentes rutas de tráfico intracelular se realizaron a su vez con la molécula MT1-MMP endógena en células de tumores primarios de pulmón. Dichas células se fijaron y tiñeron mediante técnicas de inmunofluorescencia con marcadores de las rutas de reciclaje, como el receptor de transferrina (TfRc) y Rab11. MT1-MMP

mostraba co-localización con estos marcadores en células cultivadas en ausencia de sustrato, no así en 3D-Col I (Fig. 7). Estos datos confirmaron que MT1-MMP endógeno se aloja en los compartimentos de la ruta biosintética en células invasivas, estando ausente de los compartimentos de reciclaje.



**Figura 6. Co-localización de MT1-MMP con marcadores de las rutas biosintética, de reciclaje y de degradación.** **a)** Colocalización de MT1-MMP-mRFP con VSV-G-YFP en geles 3D-Col I. Las puntas de flecha muestran vesículas positivas para MT1-MMP (rojo) y VSV-G (verde), en amarillo en la imagen superpuesta. Las fibras de colágeno se muestran en azul (imagen de reflexión). **b)** Células MDA-MB-231 se transfectaron con MT1-MMP-GFP y se embebieron en geles 3D-Col I, o se crecieron en ausencia de sustrato. Las imágenes muestran la localización de MT1-MMP (verde), Tf (azul), LDL (rojo) y la superposición de los tres. Los recuadros dentro de las imágenes muestran la superposición de la fluorescencia en pseudocolores verde/rojo, las flechas indican las vesículas donde se observa co-localización (amarillo). **c y d)** Cuantificación de la co-localización de MT1-MMP con LDL y Tf. Los histogramas en **c)** muestran la señal de fluorescencia correspondiente a las imágenes en la figura 6b. El código de color muestra las altas frecuencias en una gradación amarillo a blanco, y las bajas frecuencias en una gradación de azul a negro. El porcentaje de co-localización de MT1-MMP con Tf y LDL se muestra en la gráfica **d)**.



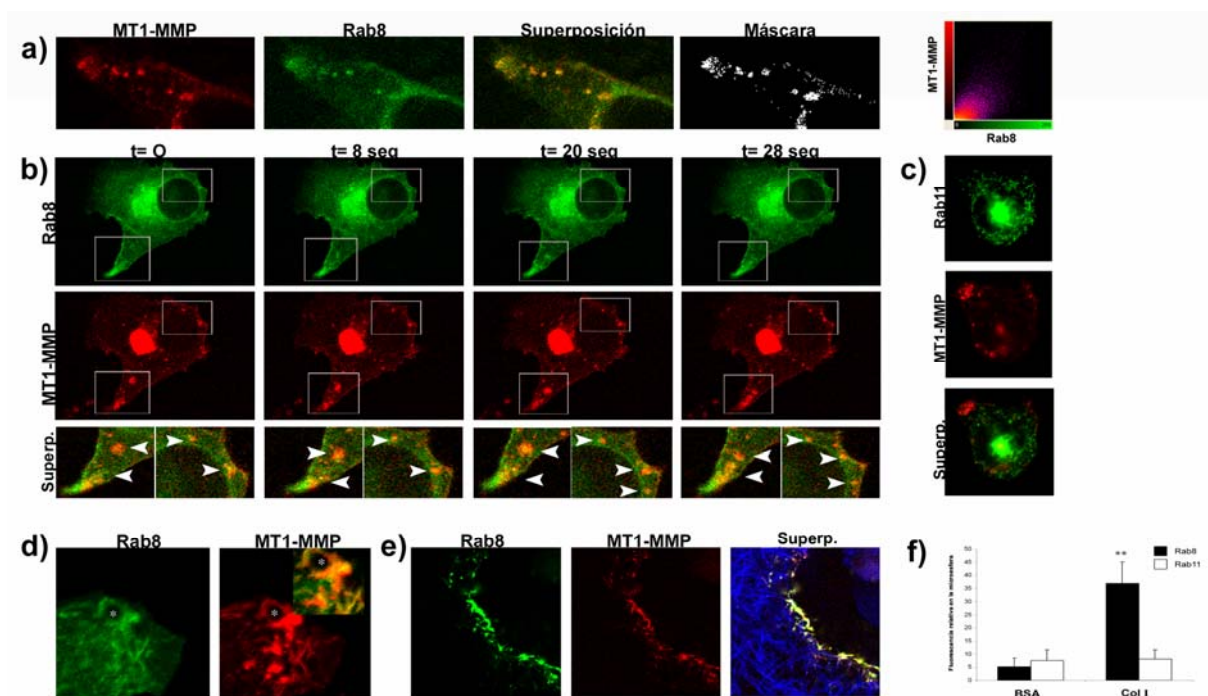
**Figura 7. Co-localización de MT1-MMP con marcadores de las rutas de reciclaje en células tumorales primarias.** Células de carcinoma de pulmón se embebieron en geles 3D-Col I o se crecieron en ausencia de sustrato, y se tiñeron mediante técnicas de inmunofluorescencia para TfRc o Rab11 (rojo) y para MT1-MMP (verde). Los recuadros dentro de las imágenes muestran la superposición de la fluorescencia en pseudocolores verde/rojo, las flechas indican las vesículas que co-localizan (en amarillo).

## 5. Rab8 PERO NO Rab11 CO-LOCALIZA CON MT1-MMP EN VESÍCULAS DE EXOCITOSIS, Y SE MOVILIZA POR LA ADHESIÓN A COLÁGENO

La GTPasa Rab8 regula el transporte polarizado de proteínas de membrana durante la formación de protrusiones (Peranen et al., 1996), lo cual sugiere que podría estar implicada en el transporte de MT1-MMP. Mediante estudios de co-localización en células embebidas en 3D-Col I pudimos observar que ambas proteínas se localizan en vesículas intracelulares (Fig. 8a). Mediante estudios de microscopía confocal en célula viva pudimos observar la presencia de MT1-MMP en vesículas Rab8-positivas transportadas hacia el frente invasivo (Fig. 8b y Video 6). Sin embargo, no se observó la co-localización de MT1-MMP con Rab11, en concordancia con los estudios de inmunofluorescencia realizados con la molécula endógena (Fig. 7). Además, las vesículas de MT1-MMP reclutadas a microesferas recubiertas de Col I muestran un elevado porcentaje de co-localización de Rab8 y MT1-MMP (Fig. 8d). También pudimos constatar una fuerte co-localización de Rab8 y MT1-MMP en los fragmentos de membrana plasmática, que son liberados por la célula durante la degradación de la matriz extracelular, y que quedan adheridos a misma (Fig. 8e). La deposición de estos



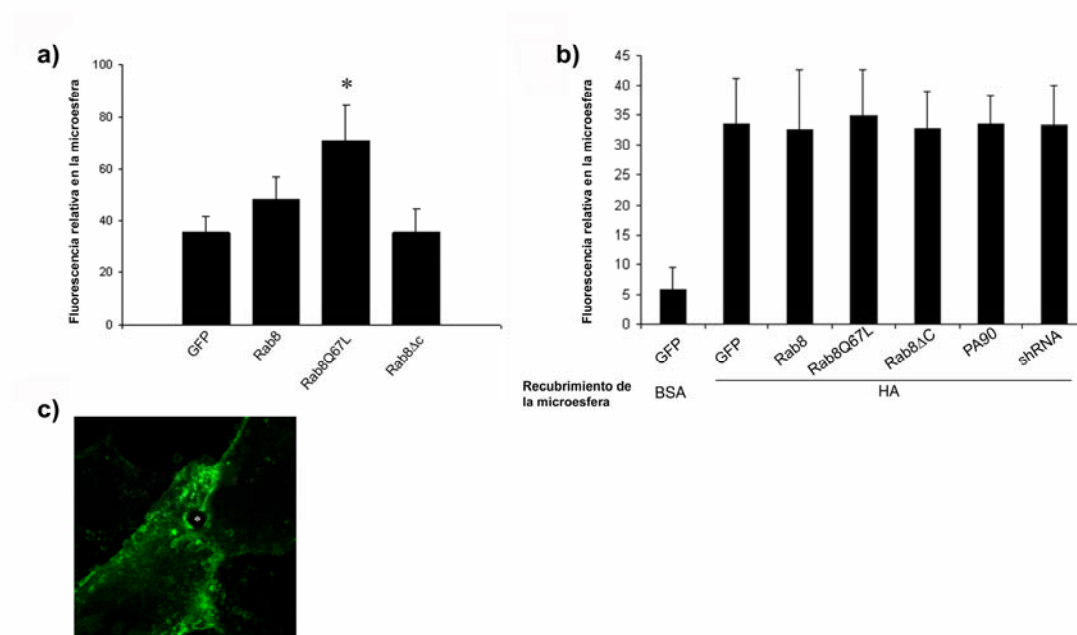
fragmentos de membrana plasmática, causados por la liberación exocítica de vesículas, ha sido relacionada con la retracción de la parte posterior de la célula durante la invasión tumoral (Friedl and Wolf, 2003; Mayer et al., 2004). MT1-MMP ha sido descrita como una de las proteínas que se encuentra en los fragmentos liberados por células endoteliales (Taraboletti et al., 2002). Estos resultados sugieren que, el tráfico y la fusión de vesículas exocíticas que transportan MT1-MMP hacia los puntos de degradación de matriz extracelular, están regulados por Rab8. Además, las microesferas recubiertas de colágeno fueron capaces de reclutar Rab8, pero no Rab11, indicando que la interacción de la célula con la matriz de colágeno (Fig. 8f) induce el tráfico de vesículas mediado por Rab8, de igual forma que lo hacía con MT1-MMP.



**Figura 8. Rab8 pero no Rab11 se co-distribuye con MT1-MMP durante el tráfico vesicular hacia estructuras invasivas.** **a)** MT1-MMP-mRFP (rojo), Rab8-GFP (verde), y la superposición de ambas fluorescencias muestran la co-localización de ambas proteínas en vesículas, que se puede observar también en la imagen de píxeles de co-localización, que muestra en color blanco los píxeles donde hay señal de fluorescencia roja y verde. El histograma de colocación de ambas proteínas se generó usando el software de análisis IMARIS (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). **b** y **c)** Experimentos de célula viva en células MDA-MB-231 embebidas en 3D-Col I muestran la colocación de MT1-MMP con Rab8 (**b**) pero no con Rab11 (**c**). **d)** Colocalización de Rab8-GFP y MT1-MMP-mRFP en zonas de la membrana plasmática que rodean a microesferas de colágeno. **e)** Co-localización de Rab8-GFP y MT1-MMP-mRFP en los fragmentos de membrana plasmática que las células liberan durante la invasión, quedando adheridos a la matriz de colágeno (azul). **f)** Análisis del reclutamiento de vesículas de Rab8 y Rab11 a microesferas recubiertas de colágeno o de BSA.

## 6. Rab8 REGULA EL TRÁFICO DE MT1-MMP HACIA ESTRUCTURAS INVASIVAS, LA DEGRADACIÓN DE COLÁGENO Y LA INVASIÓN DEPENDIENTE DE MT1-MMP

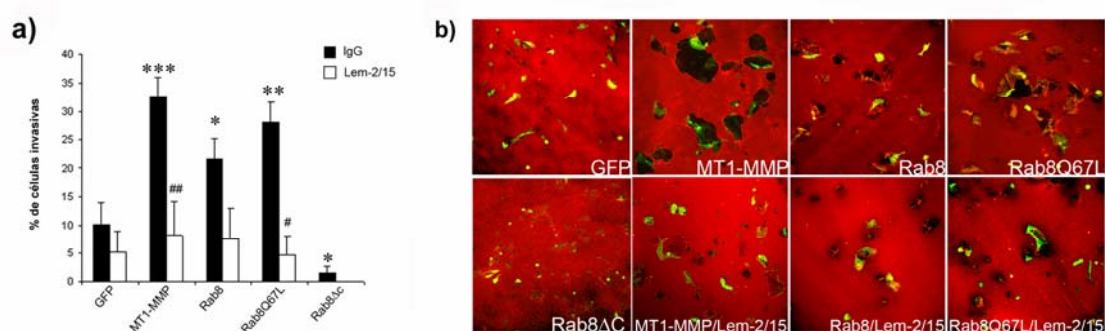
El papel de Rab8 en la regulación de la actividad de MT1-MMP se evaluó mediante experimentos de reclutamiento de vesículas en células que expresaban Rab8-WT (wild-type), el dominante activado de Rab8 (Rab8Q67L), o el mutante constitutivamente inactivo de Rab8 (Rab8  $\Delta$ C, que carece del sitio de prenilización, y por tanto incapaz de localizarse en membrana) en sus formas fusionadas a GFP. El reclutamiento de vesículas MT1-MMP-mRFP a microesferas recubiertas de colágeno se indujo mediante la expresión del dominante activado de Rab8, no así por Rab8  $\Delta$ C (Fig. 9a). La especificidad del papel de Rab8 se demostró examinando el reclutamiento de CD44 a microesferas recubiertas de ácido hialurónico, el cual no se vió afectado por la sobreexpresión de Rab8 (Fig. 9b).



**Figura 9. La activación de Rab8 induce el reclutamiento de vesículas de MT1-MMP, pero no de CD44.** **a)** Células MDA-MB-231 se transfectaron con MT1-MMP-mRFP y GFP, Rab8WT-GFP, Rab8Q67L-GFP o Rab8 $\Delta$ C-GFP, para analizar el reclutamiento de MT1-MMP a microesferas de colágeno. Las barras representan el porcentaje de fluorescencia alrededor de la microesfera, calculado en 10-18 microesferas de cada uno de los 3 experimentos independientes que se realizaron. **b)** Células MDA-MB-231 se transfectaron con CD44-mRFP y con GFP, Rab8WT-GFP, Rab8Q67L-GFP, Rab8 $\Delta$ C-GFP, Pa90-GFP o shRNARab8-GFP. Las células se incubaron durante 1h con microesferas recubiertas de BSA o de ácido hialurónico (HA). Las barras representan el porcentaje de intensidad de fluorescencia de CD44-mRFP calculado en 10-18 células en 3 experimentos independientes. **c)** Reclutamiento de CD44 a microesferas recubiertas de ácido hialurónico. El asterisco indica la localización de la microesfera.



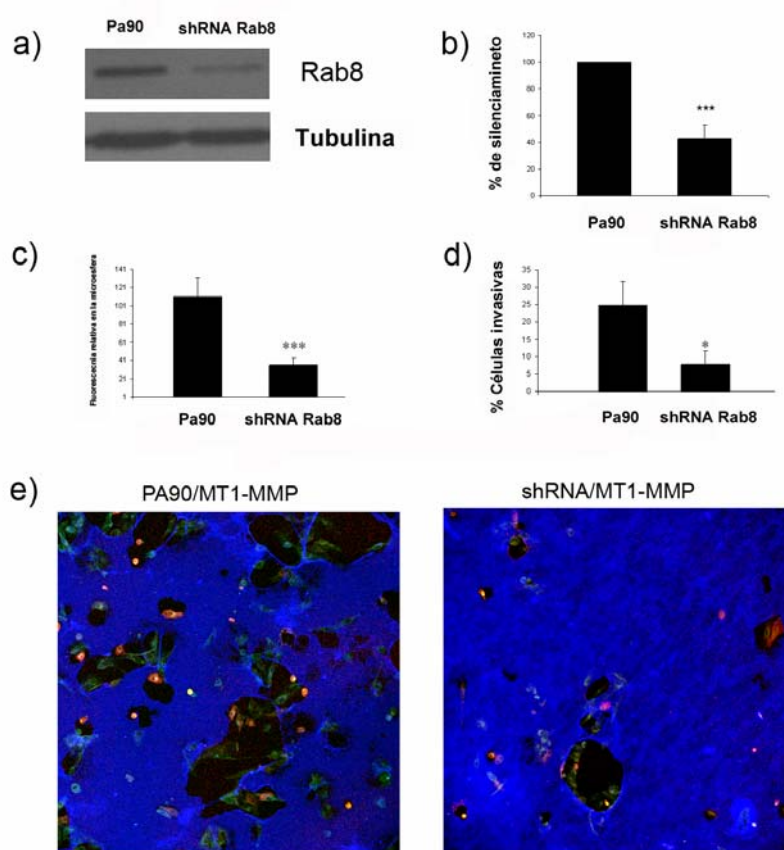
Además, se llevaron a cabo ensayos de invasión en cámaras transwell recubiertas de 3D-Col I en su parte inferior. Estos mostraron como Rab8WT y Rab8Q67L inducían un incremento de la invasión celular; mientras que Rab8  $\Delta C$  era incapaz de promover la invasión (Fig. 10a). La degradación de colágeno se estudió en células que habían sido cultivadas sobre superficies recubiertas de colágeno, y que expresaban los diferentes mutantes de Rab8. Se observó como, tanto la sobreexpresión de Rab8WT, como su activación (Rab8Q67L), inducía la degradación de colágeno tal como se reveló tras teñir la superficie de colágeno con anticuerpos anti-colágeno (rojo) (Fig. 10b). El bloqueo de la actividad de MT1-MMP con anticuerpos anti-MT1-MMP (Lem-2/15) disminuyó significativamente la invasión y la degradación de colágeno inducida por Rab8, indicando la dependencia de MT1-MMP endógeno en este proceso. Estos estudios demuestran el papel de Rab8 en la regulación del transporte de MT1-MMP hacia la membrana y en su actividad colagenolítica e invasiva.



**Figura 10. La activación de Rab8 induce la invasión y degradación de colágeno dependiente de MT1-MMP. a)** Células MDA-MB-231 se transfectaron con GFP, MT1-MMP, o los diferentes mutantes de Rab8, y se analizaron en ensayos de invasión en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de MT1-MMP (Lem-2/15). Las barras representan el porcentaje de células que han invadido la matriz de colágeno en siete experimentos diferentes, contando cuatro campos por cada experimento. **b)** Células MDA-MB-231 se transfectaron con GFP, MT1-MMP, o los diferentes mutantes de Rab8, y se crecieron sobre superficies recubiertas de colágeno (2D-Col I) en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de MT1-MMP (Lem-2/15); después de fijaron y marcaron con un anticuerpo anti-colágeno para evaluar la degradación de colágeno. Las imágenes muestran la superposición del marcaje del colágeno (rojo) y la expresión de los diferentes plásmidos (verde). El análisis estadístico muestra la comparativa con los valores de invasión del control (GFP) (\*), y la comparativa entre el control tratado con isotipo IgG o con Lem 2/15 (#). (\*/#P<0.05; \*\*/##P<0.01; \*\*\*/###P<0.001).

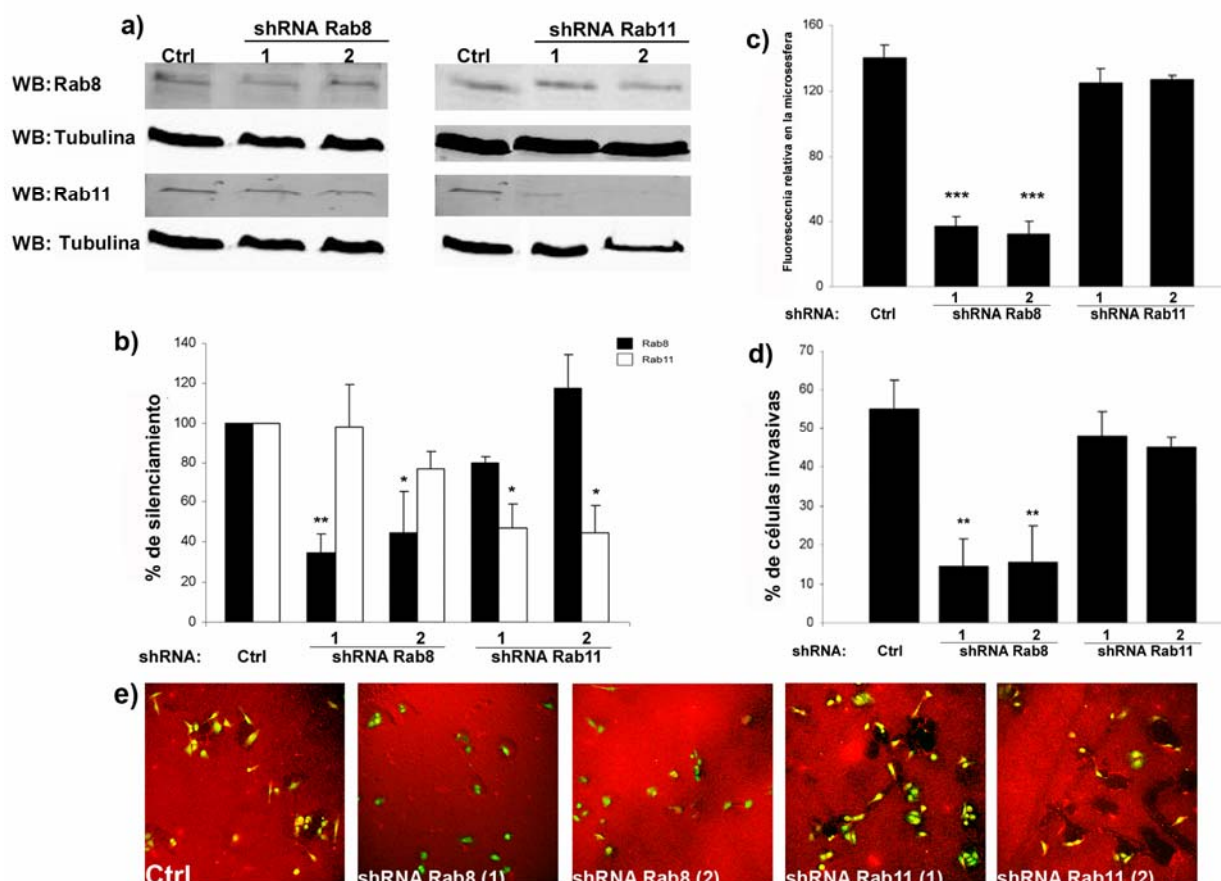
Se llevaron a cabo estudios de silenciamiento de Rab8 con el fin de demostrar el papel de Rab8 en el transporte exocítico de MT1-MMP. En este caso los vectores control (Pa90-GFP) y de silenciamiento para Rab8 (shRNARab8-GFP) se transfectaron transitoriamente con MT1-MMP-mRFP en células MDA-MB-231. El reclutamiento de vesículas de MT1-MMP a microesferas de colágeno, la invasión, y la degradación de

colágeno se vió reducida por el silenciamiento de Rab8 (Fig. 11). Además, el reclutamiento de CD44 a microesferas recubiertas de ácido hialurónico no se vió afectado por el silenciamiento de Rab8, demostrando la especificidad del transporte mediado por Rab8 (Fig. 9).



**Figura 11. El silenciamiento transitorio de Rab8 disminuye el reclutamiento de MT1-MMP a microesferas de colágeno (c), la invasión (d) y la degradación de colágeno (e). a)** Niveles de proteína en células transfectadas con el vector control Pa90 o con Rab8 shRNA analizados por Western Blot (Rab8, 37 kD; Tubulina 55 kD). **b)** Cuantificación de los niveles de proteína normalizados para el control de tubulina. Los valores representan la media de cuatro experimentos independientes.

Estos estudios se corroboraron en células MDA-MB-231 que expresaban establemente vectores de shRNA para Rab8a y Rab11a. El análisis por Western Blot mostró una disminución de los niveles de proteína de aproximadamente el 80%, y el 60 % para Rab8a y Rab11a respectivamente, según análisis realizados por Western Blot (Fig. 11a y 11b).

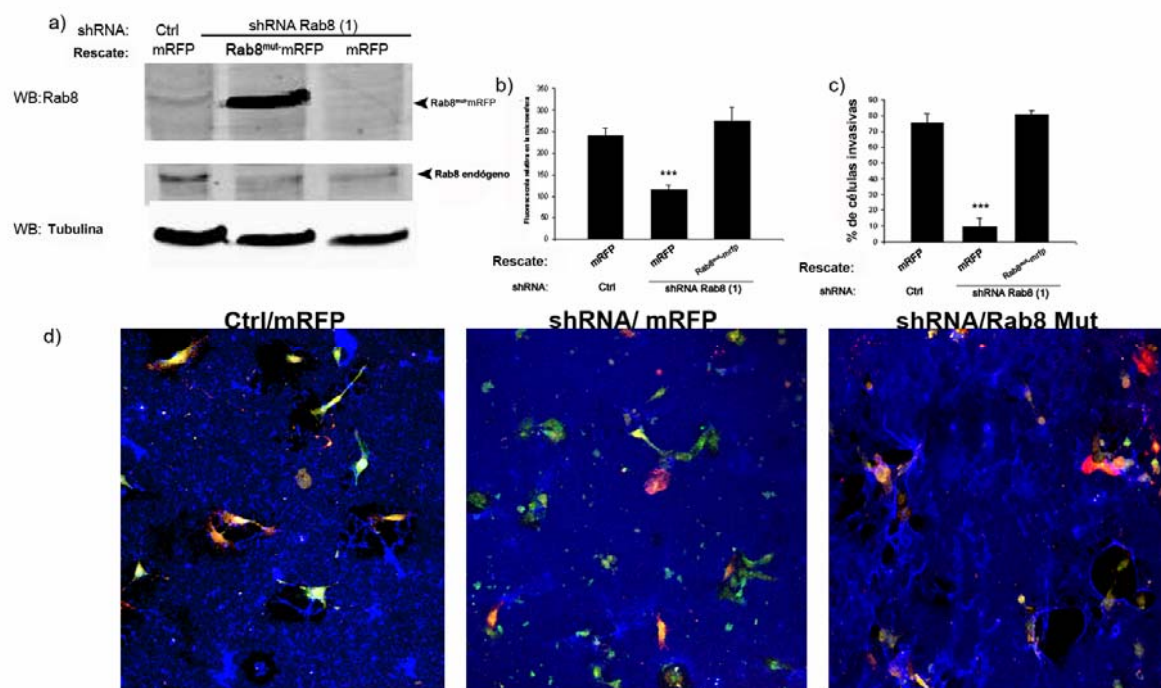


**Figura 12. El silenciamiento de Rab8 pero no de Rab11 disminuye el reclutamiento de vesículas de MT1-MMP, la degradación de colágeno y la invasión.** **a)** Niveles de proteína para Rab8 y Rab11 analizados por Western Blot (Rab8, 27 kD; Rab11, 25 kD; Tubulina, 55 kD). **b)** Cauntificación de los niveles de proteína de Rab8 y Rab11 normalizados para el control de carga, tubulina. Reclutamiento endógeno de MT1-MMP a microesferas de colágeno **c)**, ensayos de invasión y **d)** degradación de colágeno en estas líneas silenciadas para Rab8 y Rab11.

La posibilidad de tener efectos inespecíficos se estudió analizando los niveles de Rab11 en células silenciadas para Rab8 y viceversa. El reclutamiento endógeno de vesículas de MT1-MMP a microesferas recubiertas de Col I, la invasión tumoral inducida por MT1-MMP, y la degradación de colágeno fueron inhibidas en las células que expresaban shRNA para Rab8, pero no en células donde se había silenciado Rab11 (Fig. 10c, 10d y 10e).

Para demostrar de forma directa que los efectos observados por el silenciamiento de Rab8 eran específicos, se generó un vector que expresaba una secuencia codificante para Rab8, con cuatro mutaciones puntuales silenciosas en la región de reconocimiento del shRNA (Rab8-Mut). La expresión ectópica de Rab8-Mut-mRFP en líneas

silenciadas reconstituía el reclutamiento, la invasión y la degradación de colágeno (Fig.13).



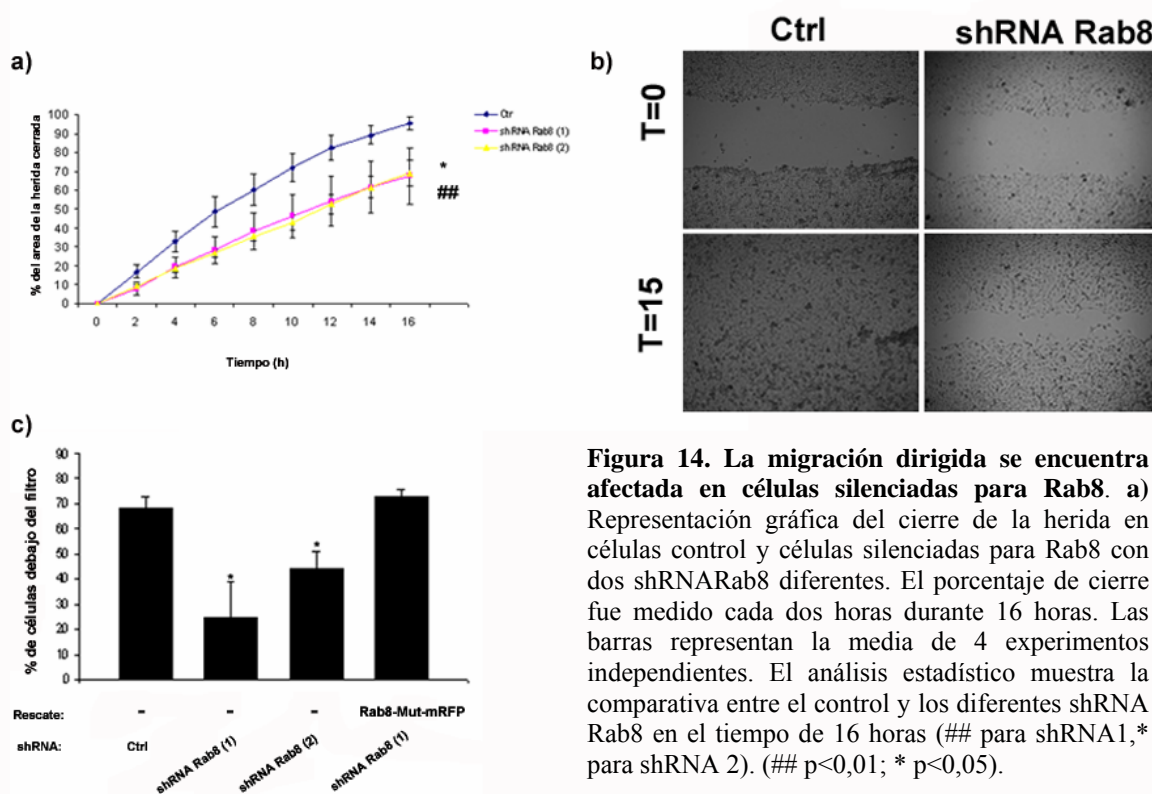
**Figura 13. El restablecimiento de la expresión de Rab8 induce el reclutamiento de vesículas de MT1-MMP, invasión y degradación de colágeno.** **a)** Expresión de Rab8-Mut-mRFP en células silenciadas para Rab8 (Rab8, 27 Kd; Rab8-mut-mRFP, 54 kD; Tubulina 55). **b)** y **c)** La expresión de Rab8-Mut-mRFP restablece el reclutamiento de vesículas y la invasión. **d)** Imágenes representativas de la degradación de colágeno (azul) en células control que expresaban mRFP, células silenciadas para Rab8 expresando mRFP, y células silenciadas para Rab8 expresando Rab8-Mut-mRFP.

Estos resultados evidencian el papel de la GTPasa Rab8 en la regulación del transporte de MT1-MMP a la membrana plasmática, la degradación de colágeno, y la invasión tumoral dependiente de MT1-MMP.

A continuación abordaremos el segundo objetivo de la presente tesis. En este caso nos propusimos estudiar la relevancia de la GTPasa Rab8 en los procesos de migración tumoral.

## 7. Rab8 ESTÁ IMPLICADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA DIRECCIONALIDAD EN LA MIGRACIÓN ALEATORIA Y EN LA MIGRACIÓN DIRIGIDA POR ESTÍMULOS EXTERNOS

Estudios previos han demostrado la capacidad de Rab8 para inducir la formación de estructuras protrusivas (Peranen et al., 1996), y su relación con la capacidad invasiva de las células tumorales (Bravo-Cordero et al., 2007). Estos antecedentes nos indujeron a pensar que Rab8 podría estar jugando un papel relevante en el proceso migratorio. Para explorar el papel de Rab8 en la migración inducida por la presencia de un estímulo externo realizamos ensayos de cierre de herida y de quimiotaxis, en células control, y en células silenciadas para Rab8. Los ensayos de heridas pusieron de manifiesto como el silenciamiento de Rab8 impide el cierre de ésta (Fig. 14a y 14b, videos 7 y 8). La quimiotaxis se estudió en ensayos en cámaras transwell, donde se analizó la capacidad de las células de migrar hacia un gradiente de EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor). Células silenciadas para Rab8 mostraron una notable reducción de la respuesta quimiotáctica a EGF, que se recuperaba mediante la expresión de Rab8-Mut-mRFP (Fig. 14c).

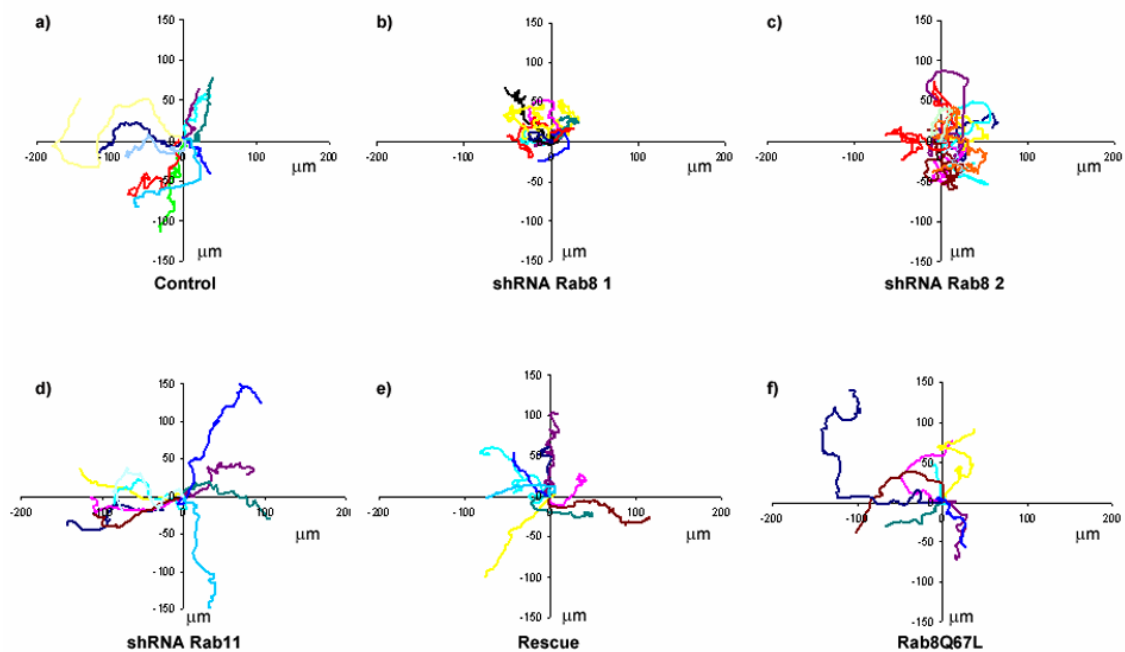


**Figura 14. La migración dirigida se encuentra afectada en células silenciadas para Rab8.** a) Representación gráfica del cierre de la herida en células control y células silenciadas para Rab8 con dos shRNARab8 diferentes. El porcentaje de cierre fue medido cada dos horas durante 16 horas. Las barras representan la media de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico muestra la comparativa entre el control y los diferentes shRNA Rab8 en el tiempo de 16 horas (## para shRNA1, \* para shRNA 2). (## p<0,01; \* p<0,05).



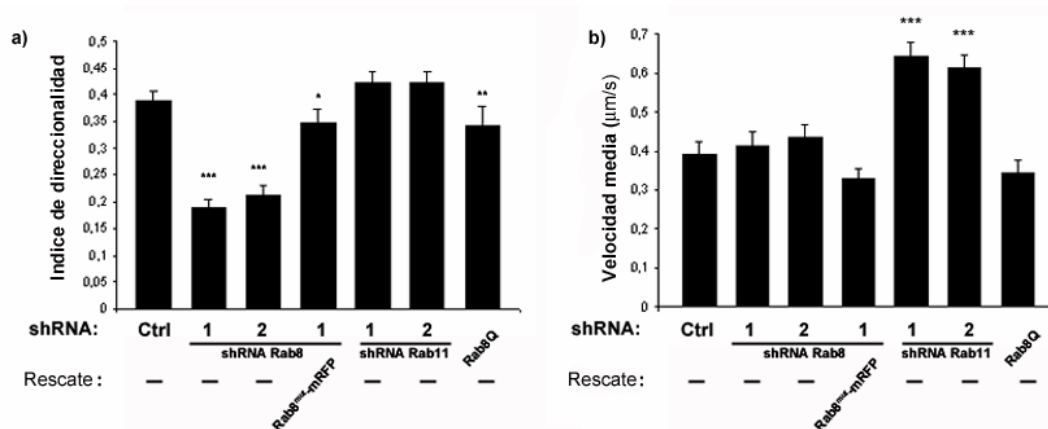
**b)** Células control y células silenciadas para Rab8 fueron rayadas con una pipeta de plástico y fotografiadas durante todo el experimento cada 15 minutos. Las imágenes muestran los tiempos inicial y final de cada condición. **c)** Filtros transwell recubiertos con FN se usaron para medir la respuesta quimiotáctica de células control, células silenciadas para Rab8 y células silenciadas para Rab8 que sobreexpresan Rab8-Mut-mRFP, usando EGF como estímulo. Las células que habían pasado el filtro a las 48 horas se contaron en cuatro campos aleatorios, en cinco experimentos diferentes. El análisis estadístico muestra la comparativa de los valores de migración en células silenciadas con los valores de migración del control (\*) (\* $P < 0.05$ ).

Realizamos diferentes ensayos de migración encaminados a analizar diversos aspectos del proceso migratorio. En primer lugar analizamos la migración independiente de estímulo, lo que nos ofrece una información más completa del proceso migratorio. La persistencia de la migración, es decir, la capacidad que tiene las células para migrar en una misma dirección durante un periodo de tiempo, en ausencia de estímulo, fue uno de los parámetros analizados. Células MDA-MB-231 que carecían de Rab8, cultivadas sobre matrices de fibronectina, mostraban un comportamiento más errático en comparación con las células control (Videos 9 y 10). Esta observación se confirmó comparando las trayectorias individuales, como se pueden observar en las graficas de la figura 15.



**Figura 15. El silenciamiento de Rab8 produce la pérdida de la persistencia de la direccionalidad.** Las trayectorias representativas de 10 células se han representado en los gráfico que representan el desplazamiento en  $x$  e  $y$  de la célula. Trayectorias representativas de células **a)** control **b)** y **c)** silenciadas para Rab8 **d)** silenciadas para Rab11 **e)** células que sobreexpresan Rab8-Mut y **f)** células que sobreexpresan Rab8Q67L sobre FN.

Con el fin de cuantificar las diferencias observadas se midió la persistencia de la direccionalidad, como “índice de direccionalidad” (ID; ratio entre la distancia neta entre el punto inicial y final de la célula durante el periodo de observación, dividido entre la distancia total recorrida por la célula) (Fig. 16a). Células silenciadas para Rab8 mostraron una notable disminución en el ID, que se restableció mediante la expresión de la construcción de rescate, Rab8-Mut-mRFP. El silenciamiento de Rab11 no afectó a la direccionalidad de la migración. En estos ensayos se midió la velocidad de migración de estas células sobre una matriz de FN, pudiéndose observar como el silenciamiento de Rab8 no afectaba a la velocidad de migración, siendo ésta de  $\approx 0,4 \mu\text{m/s}$ ; mientras que el silenciamiento de Rab11 promovía un aumento de la misma (Fig. 16b). El mutante constitutivamente activo de Rab8 (Rab8Q67L) mostró una ligera pérdida de la direccionalidad, sin observarse cambios en la velocidad en relación con los controles.



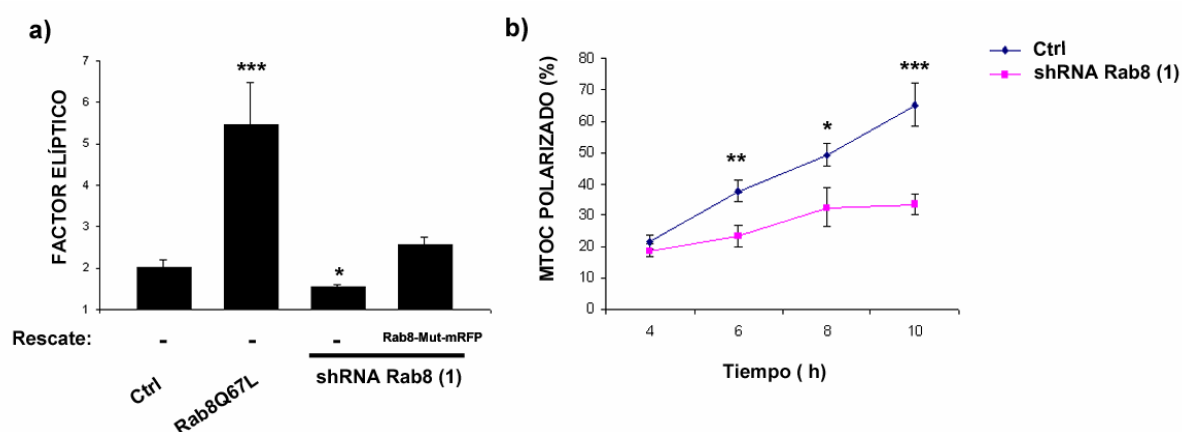
**Figura 16. Cuantificación de la persistencia de la direccionalidad y de la velocidad en ensayos de migración aleatoria.** **a)** El índice de direccionalidad fue analizado con el software Bitplane (Imaris). Cada barra representa el índice de direccionalidad promedio de 100-120 células de cada condición analizadas en 5 experimentos diferentes. **b)** El histograma representa la velocidad media de 100-120 células de cada condición analizadas en 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico muestra la comparativa de los valores de direccionalidad y velocidad de células control (\*) con células con Rab8 o Rab11 silenciado, así como células que sobreexpresan Rab8-Mut-mRFP y Rab8Q67L-GFP con células control (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

En conjunto, estos datos demuestran que Rab8 es necesario para la persistencia de la migración de células tumorales en ausencia de estímulo, y para la migración dirigida en presencia de estímulos externos.

## 8. Rab8 DETERMINA LA MORFOLOGÍA Y POLARIDAD CELULAR

La activación de Rab8 promueve la generación de protrusiones (Peranen et al., 1996). Para analizar el papel de Rab8 sobre la morfología celular se estudiaron células MDA-MB-231 control, células que sobreexpresaban Rab8Q67L y células silenciadas establemente para el gen Rab8. Calculamos el factor elíptico (EF), que se define como el ratio entre el eje mayor y el eje menor de la célula, en células cultivadas sobre matrices de fibronectina para cuantificar estos efectos morfológicos. Las células que sobreexpresan Rab8Q67L presentaban un EF significativamente mayor que las células control, mientras que las que carecían de Rab8 mostraron una disminución significativa del EF (Fig. 17a). La expresión de Rab8-Mut-mRFP en células silenciadas para Rab8 revertía este efecto a nivel morfológico. Estos resultados demuestran que Rab8 induce la adquisición de un fenotipo elongado.

Con el fin de analizar el papel que juega Rab8 en la polaridad celular inducida por estímulos externos medimos la polarización del MTOC en ensayos de cierre de herida, comparando las células de fenotipo salvaje, con las que tenían el gen de Rab8 silenciado establemente (shRNA Rab8). La reorientación de MTOC se vió reducido significativamente en células que carecían de Rab8 (Fig.17b). En conjunto estos resultados demuestran que Rab8 esta implicado en la morfología celular y en la polarización celular.

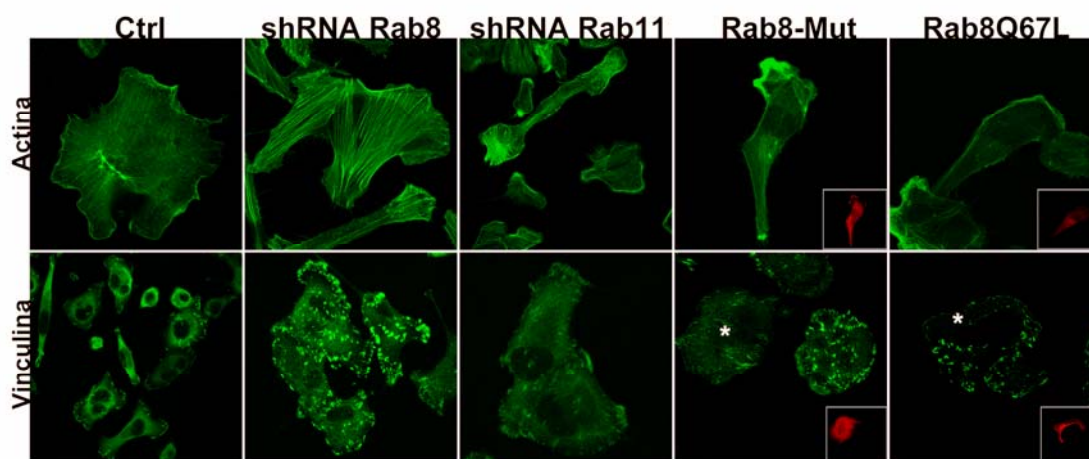


**Figura 17. Rab8 es necesario para la adquisición de un fenotipo polarizado. a)** El EF (largo/ancho), se utilizó en células MDA-MB-231 control, sobreexpresando Rab8Q67L, silenciadas para Rab8 y silenciadas para Rab8 que expresaban Rab8-Mt-mRFP, crecidas sobre FN, como medida de la morfología celular. **b)** El porcentaje de células en la fila frontal de la herida que muestran reorientación del MTOC hacia la herida se midió a los tiempos indicados después de realizar la herida. El análisis estadístico muestra la comparativa de los valores del control y los valores de células que sobreexpresan Rab8Q67L o con Rab8 silenciado, en las medidas de EF y la comparativa entre células control y células silenciadas para Rab8 en el análisis del MTOC (\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).



## 9. Rab8 PROMUEVE REORDENAMIENTOS DEL CITOESQUELETO DE ACTINA Y REGULA LA FORMACIÓN DE ADHESIONES FOCALES

Rab8 promueve la polimerización de actina cortical durante la formación de protrusiones (Peranen et al., 1996). Con el fin de estudiar en profundidad los reordenamientos del citoesqueleto analizamos células MDA-MB-231 que expresaban transitoriamente Rab8Q67L, o bien silenciadas para Rab8. En concordancia con estudios anteriores, Rab8Q67L indujo la polimerización de actina cortical en el lamelipodio. Mientras que, el silenciamiento de Rab8 promovió la formación de fibras de estrés y la desaparición de estructuras lamelares ricas en actina (Fig. 18). La sobreexpresión de Rab8-Mut-mRFP en células silenciadas para Rab8 rescató este fenotipo induciendo nuevamente lamelipodios ricos en actina. Los efectos observados en las células silenciadas para Rab8 no se observaron en células silenciadas para Rab11, lo que demostró su especificidad.

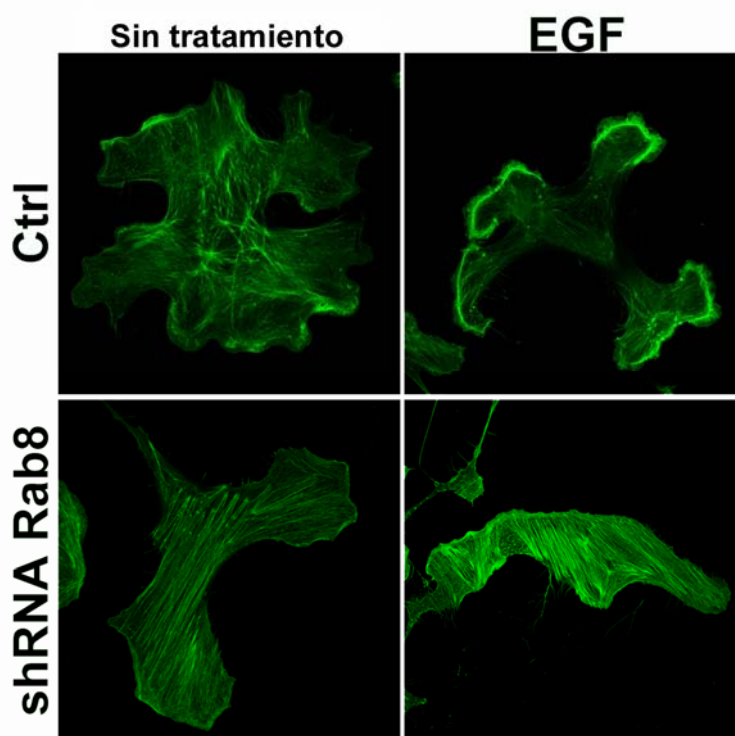


**Figura 18. Rab8 promueve la reorganización del citoesqueleto de actina y regula la formación de adhesiones focales.** Imágenes representativas de células control, silenciadas para Rab8, para Rab11, silenciadas para Rab8 y sobreexpresando Rab8-Mut-mRFP o sobreexpresando Rab8Q67L cultivadas sobre FN y fijadas para después teñir para inmunofluorescencia con Faloidina-Alexa-594 o Faloidina-Alexa-647 (Rab8-Mut-mRFP) para detectar la actina. Las adhesiones focales se marcaron con un anticuerpo anti-vinculina y reveladas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con CY3 o con Alexa-647 (Rab8-Mut-mRFP). Los recuadros muestran la célula que expresa Rab8-Mut-mRFP o Rab8Q67L.

Nos planteamos si Rab8 tendría también un papel sobre la formación de las adhesiones focales, al igual que ocurría con el citoesqueleto de actina. El análisis por inmunofluorescencia de células MDA-MB-231 teñidas con un anticuerpo anti-vinculina nos permitió analizar el estado de las adhesiones focales. Células que expresaban

Rab8Q67L presentaban una disminución drástica en el número y tamaño de las adhesiones focales, en comparación con los controles, que se localizaban en la periferia de la célula y desapareciendo del cuerpo celular (Fig. 18). Este tipo de adhesiones, fruto de la sobreexpresión de Rab8Q67L, se asemejan a los complejos focales inducidos por la GTPasa Rac en las fases tempranas de formación de la adhesión focal. El silenciamiento de Rab8, por el contrario, produjo un aumento dramático del número y tamaño de las adhesiones focales, que se disminuía tanto en la periferia como en el cuerpo celular viéndose revertido el fenotipo cuando sobreexpresábamos Rab8-Mut-mRFP. No se observaron diferencias en células silenciadas para Rab11.

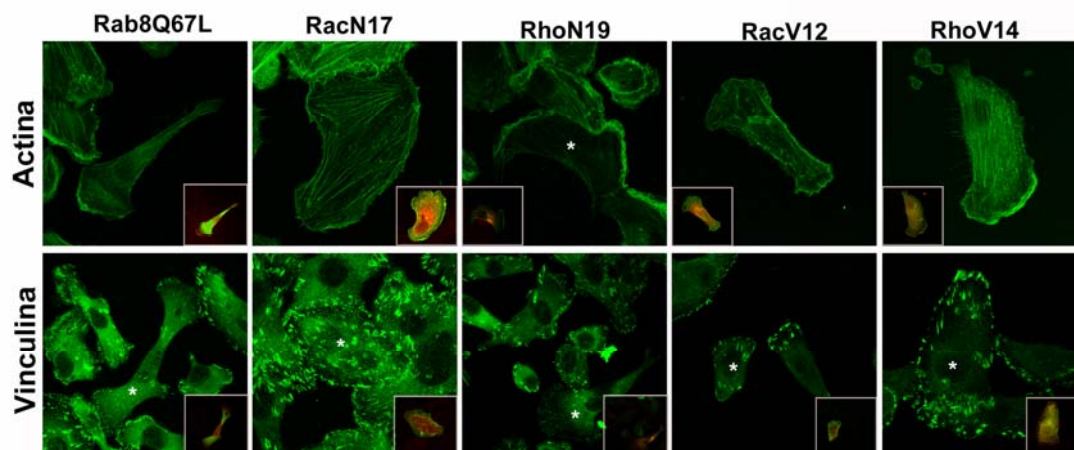
La estimulación de células con EGF promueve la formación de lamelipodios, a través de la activación de Rac (Shinohara et al., 2002). El silenciamiento de Rab8 abolió los lamelipodios inducidos por EGF (Fig. 19). Estos resultados demuestran claramente el importante papel que juega Rab8 en la reorganización del citoesqueleto de actina, así como en la formación de las adhesiones focales.



**Figura 19. Inhibición de lamelipodios inducidos por EGF en células silenciadas para Rab8.** Células control, y células silenciadas para Rab8 se plaquearon sobre FN. Se mantuvieron en ausencia de suero durante una hora, y se estimularon con 50nM EGF durante 30 minutos. Las células se fijaron y tiñeron con Faloidina-Alexa-594 para revelar el citoesqueleto de actina.

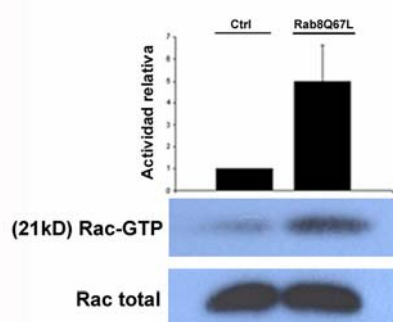
## 10. LAS GTPasas DE LA FAMILIA Rho MEDIAN LOS REORDENAMIENTOS DEL CITOESQUELETO INDUCIDOS POR Rab8

El efecto de la activación y el silenciamiento de Rab8 a nivel de citoesqueleto de actina y adhesiones focales sugieren alteraciones en la actividad de las GTPasas de la familia Rho, que son los principales reguladores de los reordenamientos del citoesqueleto celular (Raftopoulou and Hall, 2004). El fenotipo inducido por la expresión de Rab8Q67L es similar al que promueve la activación de Rac, mientras que el silenciamiento de Rab8 induce un fenotipo semejante al que produce la activación de Rho. Por ello, nuestra hipótesis de trabajo consistió en que Rab8 estaría activando Rac e inhibiendo Rho, regulando de esta forma los reordenamientos del citoesqueleto descritos anteriormente. Para confirmar si dicha hipótesis era cierta se utilizaron mutantes de Rho y Rac, que mantienen las GTPasas en su estado activo (mutantes constitutivamente activados, RacV12 y RhoV14) o en su estado inactivo (mutantes dominantes negativos, Rac N17 y Rho N19). Utilizando dichos mutantes llevamos a cabo experimentos para intentar revertir el fenotipo inducido por la expresión de Rab8Q67L o el silenciamiento de Rab8. De esta forma analizamos el papel de las GTPasa de la familia Rho en los efectos inducidos por Rab8 a nivel de citoesqueleto. Como ya habíamos reportado, la expresión de Rab8Q67L promovía la reorganización de actina a las protrusiones de nueva formación y un defecto en la maduración de adhesiones focales. La expresión en estas células del dominante negativo de Rac (Rac N17), así como el mutante constitutivamente activo de Rho (Rho V12), revirtió este efecto recuperándose el patrón de fibras de estrés, inhibiéndose la formación de lamelas, e incrementándose en número y tamaño las adhesiones focales (Fig. 20). La expresión de RacV12 y Rho N19 por el contrario, no rescataron el fenotipo normal tras la expresión Rab8Q67L. Estos resultados indican que Rab8Q67L podría estar activando Rac.



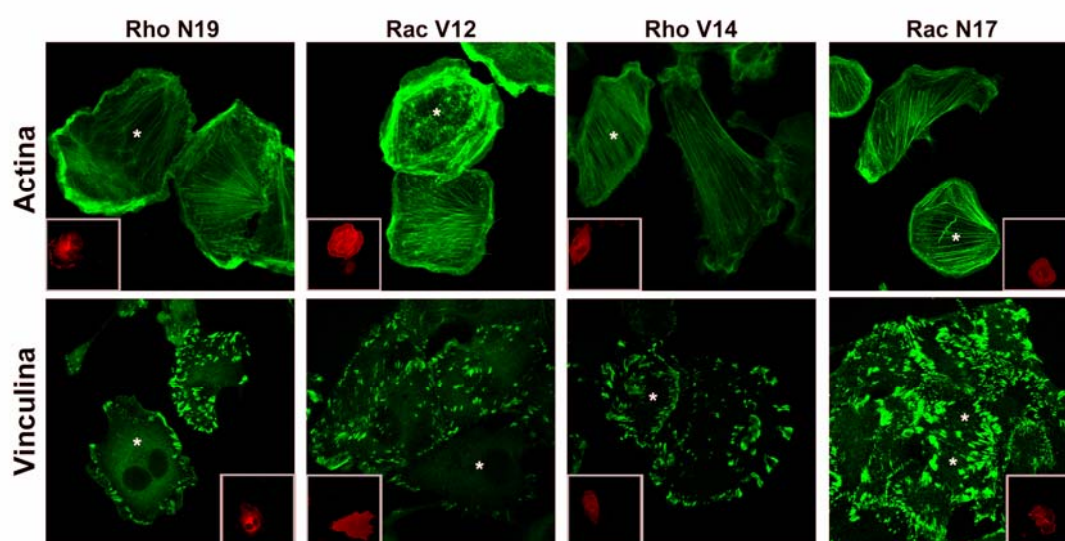
**Figura 20. El fenotipo inducido por la activación de Rab8 sobre el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales es revertido por la sobreexpresión de Rac N17 y Rho V14.** Células MDA-MB-231 se transfectaron con Rab8Q67L-mRFP y con los dominantes activados o dominantes negativos de Rho y Rac (Rac N17-GFP, Rho N19-GFP, Rac V12-GFP, Rho V14-GFP o vector vacío GFP) y se crecieron sobre FN. Las fibras de stress se detectaron con Faloidina-Alexa-647, las adhesiones focales se tiñieron con un anticuerpo anti-vinculina y fueron reveladas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-647. Los recuadros dentro de las imágenes muestran la superposición de la fluorescencia en verde/rojo, canal rojo (Rab8Q67L-mRFP) y el canal verde (mutantes de Rac y Rho en su forma GFP).

Con el fin de esclarecer este punto llevamos a cabo experimentos de “*pull-down*” para determinar los niveles de activación de Rac. Células que sobreexpresaban Rab8Q67L mostraron un notable incremento en los niveles de Rac unido a GTP (Fig. 21). Estos resultados demuestran que Rab8 activa Rac.



**Figura 21. La sobreexpresión de Rab8Q67L induce la activación de Rac.** Células HT1080 que expresaban establemente GFP o Rab8Q67L se utilizaron para ensayos de “*pull-down*”. Utilizando la construcción GST-PAK se precipito Rac unido a GTP que se sometió a electroforesis en geles del 13% SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de polivinilideno difluoro y reveladas con anti-Rac1. Se muestra un gel representativo. El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad relativa de Rac normalizada para la cantidad de Rac en el lisado total y expresada como el ratio Rab8Q67L/ Ctrl en tres experimentos independientes.

Células silenciadas para Rab8 muestran un notable incremento de fibras de estrés y de adhesiones focales. La expresión en estas células del dominante negativo de Rho (RhoN19), así como del mutante constitutivamente activo de Rac (RacV12) revirtió este efecto, recuperándose la formación de lamelas y disminuyendo en número y tamaño las adhesiones focales (Fig. 22). La expresión de RhoV14 y Rac N17 por el contrario, no rescató el fenotipo (Fig. 22). Estos experimentos indican que estas células presentan un desequilibrio en la actividad de las Rho GTPas, resultando una elevada actividad de Rho e inhibición de Rac.



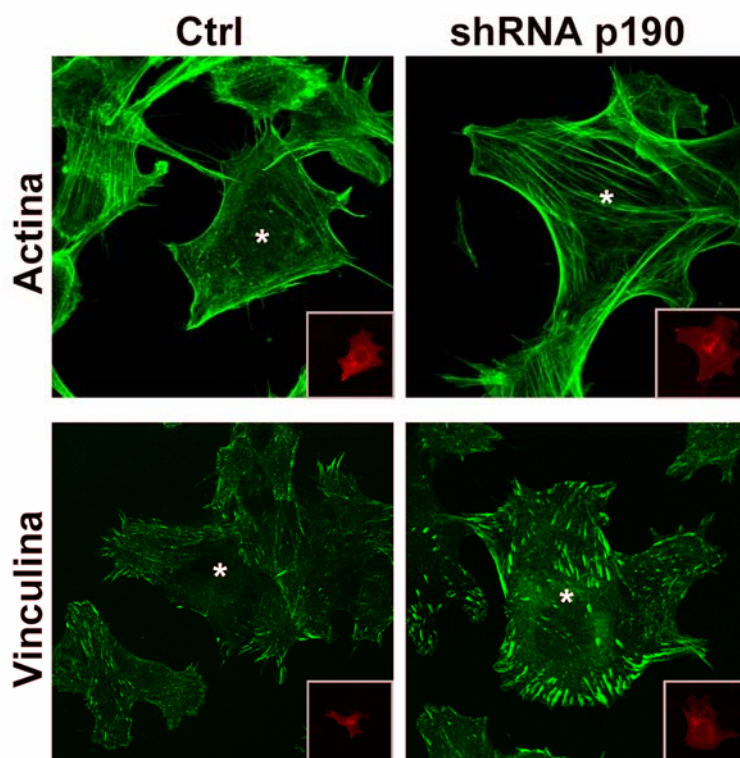
**Figura 22. El fenotipo inducido por el silenciamiento de Rab8 sobre el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales es revertido por la sobreexpresión de Rho N19 y Rac V12.** Células MDA-MB-231 silenciadas para Rab8 se transfectaron con los dominantes activados o dominantes negativos de Rho y Rac (Rac N17-GFP, Rho N19-GFP, Rac V12-GFP, Rho V14-GFP) y se crecieron sobre FN. Las fibras de estrés se detectaron con Faloidina-Alexa-647, las adhesiones focales se tiñieron con un anticuerpo anti-vinculina y fueron reveladas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-647. Los recuadros dentro de las imágenes muestran la superposición de la fluorescencia en verde/rojo, canal rojo (Rab8Q67L-mRFP) y el canal verde (mutantes de Rac y Rho en su forma GFP).

En conjunto, estos resultados sugieren que Rab8 activa Rac e inhibe Rho, sin embargo, hasta el momento no hemos obtenido resultados concluyentes que nos permitan inferir que Rab8 induzca la inhibición de Rho.

Rac está implicado en la inhibición de Rho a través de p190RhoGap (Nimnual et al., 2003). Los experimentos anteriormente descritos sugieren una inhibición de Rho mediada por la activación de Rac, dependiente de Rab8. La proteína p190RhoGap inhibe la actividad de Rho al estimular la actividad GTPasa intrínseca de Rho, promoviendo el intercambio de GTP por GDP. Para analizar el papel de p190Rho GAP



en la regulación de Rho mediada por Rab8 utilizamos líneas que carecían de p190 RhoGap, donde inducimos la activación de Rab8 mediante la sobreexpresión de Rab8Q67L. En células control, Rab8Q67L promovía la desaparición de las fibras de estrés y de las adhesiones focales, tal y como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en células que carecían de p190RhoGap no se observó el efecto mediado por la sobreexpresión de Rab8Q67L, observándose unas adhesiones focales y fibras de estrés similares a las células en las que no se había inducido activación de Rab8 (Fig. 23).



**Figura 23. El silenciamiento de p190 RhoGap rescata el fenotipo inducido por Rab8Q67L.** Células silenciadas para p190 RhoGap y transfectadas con Rab8Q67L se tiñeron con Faloidina-Alexa-647, o anti-vinculina y posteriormente reveladas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-647.

Estos resultados indican que Rab8 induce la inhibición de Rho mediada a través de p190 RhoGap, promoviendo la formación de protrusiones e inhibiendo la maduración de adhesiones focales.

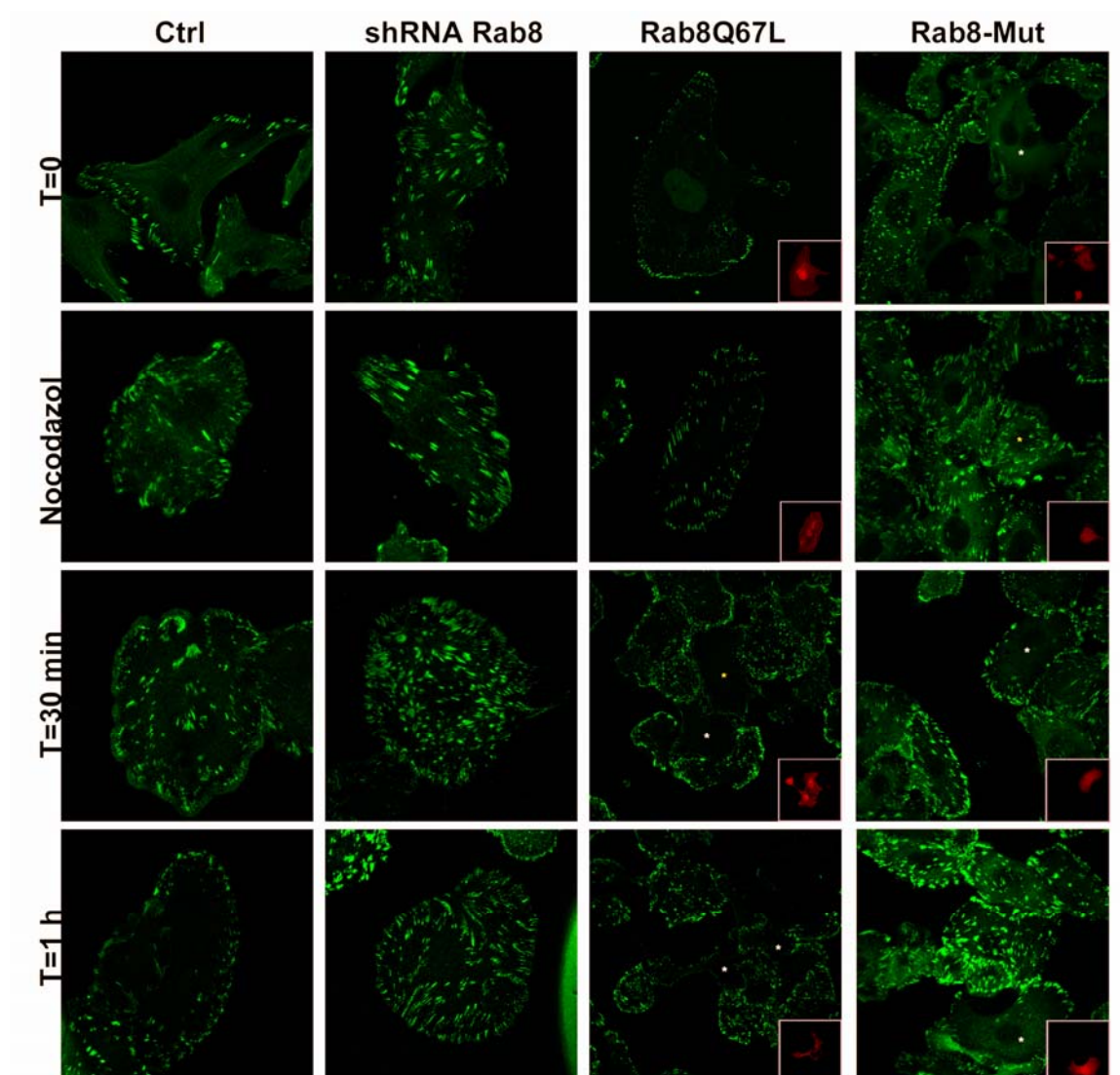
## 11. Rab8 ES NECESARIO PARA EL DESENSAMBLAJE DE LAS ADHESIONES FOCALES

La formación de las adhesiones focales es un proceso muy complejo que conlleva un ciclo de formación, maduración y desensamblaje. Los resultados anteriormente descritos sugieren que Rab8 juega un papel en la maduración de estas estructuras. Sin embargo, quisimos analizar en mayor profundidad la función de Rab8 en el establecimiento de las adhesiones focales evaluando su implicación en el desensamblaje de estas estructuras.

El recambio de adhesiones focales está regulado por el crecimiento de los microtúbulos, que transportan señales de relajación, regulando la dinámica de la adhesión focal (Kaverina et al., 1999). Nosotros postulamos que Rab8 constituye una señal de relajación como parte de los mecanismos de desensamblaje de las adhesiones focales.

Uno de los problemas al estudiar el desensamblaje de las adhesiones focales es que en condiciones normales es un proceso asincrónico. El modelo de desensamblaje inducido por microtúbulos solventa este punto, al permitir estudiar el fenómeno del desensamblaje *in situ*. En trabajos anteriores se ha puesto a punto un ensayo de análisis de los procesos de desensamblaje, que consiste en el tratamiento de las células con nocodazol y posterior retirada. Este agente que despolimeriza los microtúbulos produce un aumento de adhesiones focales al impedir la llegada de las señales de relajación a las mismas. El lavado del nocodazol restablece el crecimiento de los microtúbulos, promoviendo el desensamblaje de la adhesión focal (Ezratty et al., 2005). Para evaluar el papel de Rab8 en el desensamblaje de las adhesiones focales realizamos dicho ensayo en células que habían sido silenciadas para Rab8 o que expresaban Rab8Q67L. Como se esperaba, el tratamiento con nocodazol incrementó el número y tamaño de adhesiones focales, que tras una hora de lavado se dejaron de observar (Fig. 24). En células silenciadas para Rab8 el desensamblaje de la adhesión focal inducido por el lavado del nocodazol no se llegó a producir. Tras treinta minutos y una hora de retirada del nocodazol, las adhesiones siguieron incrementando en número y en tamaño sugiriendo un defecto en el desensamblaje de adhesiones focales en estas células, debido a la ausencia de Rab8. La sobreexpresión de Rab8-Mut-mRFP rescató la capacidad de las células para desensamblar las adhesiones focales tras el lavado con el nocodazol.

Por el contrario, en células que expresan Rab8Q67L no se observó un incremento tan acentuado de las adhesiones focales tras el tratamiento con nocodazol, debido a que partimos de un basal muy reducido. De acuerdo con lo esperado, estas células desensamblan la adhesión focal más rápido que los controles, a los treinta minutos de lavado se produjo la pérdida completa de la adhesión, en contraste con las células que no expresaban Rab8Q67L, que se observan en la imagen rodeando a estas.



**Figura 24. Rab8 esta implicado en el desensamblaje de las adhesiones focales.** Células MDA-MB-231 control, silenciadas para Rab8, silenciadas para Rab8 sobreexpresando Rab8-Mut-mRFP o células que sobreexpresaban Rab8Q67L crecidas sobre FN, se trataron con nocodazol (10 $\mu$ M). Tras cuatro horas de tratamiento, el nocodazol fue lavado y las células se fijaron y tiñeron con anticuerpo anti-vinculina y posteriormente reveladas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa647. Los recuadros muestran la célula que expresa Rab8-Mut-mRFP o Rab8Q67L (en rojo).

Estos resultados sugieren un nuevo papel para Rab8, en el desensamblaje de la adhesión focal.



## *V. Discusión*

## 1. REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE MT1-MMP EN CÉLULAS INVASIVAS

Las células tumorales se encuentran confinadas en una matriz tridimensional que representa una barrera contra el avance celular. La degradación de esta matriz extracelular es un proceso de suma importancia para la invasión tumoral, permitiendo a las células neoplásicas atravesar los tejidos, entrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, y generar metástasis en órganos distantes (Chambers et al., 2002). La degradación de dicha matriz está mediada por la actividad de proteasas que se encuentran localizadas en el frente de avance celular. Dentro de estas proteasas, la metaloproteinasa MT1-MMP juega un papel clave en este proceso, puesto que su eliminación lleva a severos defectos a nivel de tejido conectivo (Holmbeck et al., 1999), y a la incapacidad de las células de invadir matrices tridimensionales complejas (Hotary et al., 2000; Hotary et al., 2003; Sabeh et al., 2004). Estudios previos muestran la localización de MT1-MMP en estas estructuras invasivas (Artym et al., 2006; Lehti et al., 2000; Nakahara et al., 1997) y ponen de manifiesto su papel activo en este proceso.

Las matrices fibrilares de colágeno remedan el ambiente tisular donde se encuentran las células tumorales, y representan un modelo muy útil para estudiar la invasión tumoral. Estas matrices tridimensionales nos permiten, además, monitorizar la integridad de la matriz extracelular durante la invasión. En este trabajo se muestra la redistribución de MT1-MMP a las zonas de anclaje a colágeno, y su actividad colagenolítica, mediante estudios dinámicos de microscopía confocal en células MDA-MB-231 embebidas en matrices tridimensionales (3D-Col I).

### 1.1 Señalización mediada por integrinas durante el reclutamiento de MT1-MMP a estructuras invasivas

Nuestro trabajo demuestra que la adhesión de la célula a componentes de la matriz extracelular, a través de las integrinas, es la señal desencadenante del reclutamiento activo de MT1-MMP hacia estructuras invasivas. La integrina  $\beta 1$  parece ser la responsable del reclutamiento de MT1-MMP, en respuesta a la unión a la matriz de colágeno. En concordancia con estos resultado las señales mediadas por integrinas aumentan la expresión, la localización, y la actividad de MT1-MMP y otras metaloproteinasas (Ellerbroek et al., 2001). Además, la acumulación conjunta de integrinas  $\beta 1$  y MT1-MMP se ha puesto de manifiesto en células tumorales invadiendo

matrices tridimensionales (Wolf et al., 2003), así como en células endoteliales adheridas a superficies recubiertas de colágeno (Galvez et al., 2002).

Si bien el papel de las Rho GTPasas en el tráfico exocítico ha sido poco estudiado, hay algunas evidencias que implican a estas proteínas en dicho tráfico. Rho y Rac han sido implicadas en la regulación de la exocitosis en células endocrinas, mastocitos y células neuronales (Doussau et al., 2000; Pinxteren et al., 2000) y se postula que Cdc42 actúa en múltiples puntos a lo largo del proceso exocítico. El papel de estas GTPasas en la regulación de la exocitosis de MT1-MMP no está claro, aunque se podría hipotetizar que las reorganizaciones del citoesqueleto celular, controladas en última instancia por estas GTPasas, podrían regular la exocitosis de MT1-MMP (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998). Los resultados presentados sugieren un papel importante de Rho y Rac en el reclutamiento de MT1-MMP a estructuras invasivas, que, como hemos comentado, posiblemente ocurra a través de la reorganización del citoesqueleto de actina promovido por éstas.

## 1.2 Reclutamiento de MT1-MMP a estructuras invasivas en matrices tridimensionales

La expresión de proteínas en la membrana plasmática está controlada por el proceso de secreción constitutiva, y puede ser regulado por la síntesis *de novo*, o la degradación de la proteína ya existente. Adicionalmente, las células pueden controlar de manera rápida los niveles de expresión en membrana de un gran número de receptores, canales, y transportadores manteniéndolos presintetizados en un compartimento de almacenaje, desde donde se puede inducir una rápida inserción en la membrana (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). Este proceso implica la exocitosis regulada, que consiste en la translocación de proteínas, desde compartimentos intracelulares de almacenaje, hasta la membrana plasmática, como consecuencia de una estimulación previa (Chieriegatti and Meldolesi, 2005). La exocitosis polarizada de moléculas hacia el frente de avance de las células en migración se ha descrito, no solo para productos de secreción, sino también para productos de reciclaje, como es el caso de las integrinas (Lawson and Maxfield, 1995). El reciclaje de vesículas, endocitadas en la parte de atrás de la célula, se ha sugerido como un mecanismo causante de la extensión de la membrana durante la migración. MT1-MMP se ha descrito como una molécula que se almacena en compartimentos intracelulares, (Galvez et al., 2002; Jiang et al., 2001;

Remacle et al., 2003; Uekita et al., 2001; Wang et al., 2004b) y su expresión en membrana es muy débil en la mayoría de los tipos celulares. Hay evidencias claras de que esta molécula está sujeta a endocitosis (Galvez et al., 2002; Jiang et al., 2001; Uekita et al., 2001) y reciclaje hacia la superficie celular (Remacle et al., 2003; Wang et al., 2004b) en células estacionarias. Sin embargo, hasta el momento no se había puesto de manifiesto la regulación de MT1-MMP por la vía de exocitosis regulada.

Seiki y colaboradores han sugerido la interacción de MT1-MMP con CD44, y en última instancia, el anclaje de CD44 al citoesqueleto de actina a través de su interacción con los adaptadores de la familia de las ERM, como el mecanismo encargado de transportar MT1-MMP hacia el frente celular durante la migración (Kajita et al., 2001; Mori et al., 2002; Suenaga et al., 2005). Nuestros datos en matrices tridimensionales establecen una perspectiva diferente de la regulación de la actividad de MT1-MMP, sugiriendo el mecanismo de la exocitosis de vesículas de MT1-MMP como el responsable del reclutamiento de MT1-MMP en las estructuras invasivas. Esta hipótesis está sustentada en una serie de evidencias experimentales: 1) la visualización dinámica de vesículas de MT1-MMP que están siendo reclutadas hacia la superficie celular desde compartimentos intracelulares, en sitios de anclaje con fibras de colágeno, donde se localiza una nueva protrusión 2) los experimentos de FRAP/FLIP, mostrando la importancia de los compartimentos submembranosos de vesículas en la acumulación de MT1-MMP en las estructuras invasivas y 3) el requerimiento de la actividad de la GTPasa Rab8, implicada en: la regulación del tráfico exocítico, el reclutamiento de MT1-MMP inducido por colágeno, la degradación de colágeno y la invasión dependiente de MT1-MMP. En concordancia con esta hipótesis, en células HT1080 se ha descrito la presencia de un compartimento de almacenaje intracelular de MT1-MMP, disponible para el transporte hacia la superficie celular después de la estimulación con Concanavalina A, un activador de la progelatinasa A (Zucker et al., 2002).

Nuestros resultados demuestran que en células embebidas en matrices fibrilares de colágeno, MT1-MMP está confinada en un compartimento dentro de la ruta de tráfico biosintético, y se encuentra ausente de compartimentos de reciclaje. Una serie de trabajos, anteriormente publicados evidencian que el transporte biosintético hacia la membrana ocurre a través de los endosomas de reciclaje (Ang et al., 2004; Futter et al., 1995; Leitinger et al., 1995; Lock and Stow, 2005) lo que resulta contradictorio con nuestros datos. Sin embargo, un gran número de estudios en célula viva sugieren la

existencia de una ruta directa de transporte biosintético desde el complejo del Golgi hacia la membrana plasmática, que no transcurre a través de los endosomas de reciclaje. Esta podría estar mediando el transporte de MT1-MMP hacia las estructuras invasivas (Lippincott-Schwartz et al., 2000; Lock and Stow, 2005). Nuestros resultados muestran como la compartimentalización de MT1-MMP depende del contexto extracelular en el que se encuentre ubicada la célula. Estos datos sugieren que, en ausencia de un estímulo que promueva la degradación de matriz extracelular, MT1-MMP estaría en un continuo reciclaje. Así mantendría su actividad de membrana controlada, restringiendo el número de moléculas presentadas en la superficie celular permitiendo su almacenaje en compartimentos intracelulares para su rápida movilización en caso de que fuera necesario. Así, en presencia de un estímulo para degradar matriz extracelular, MT1-MMP se movilizaría rápidamente hacia las zonas donde se está produciendo una degradación activa de matriz. Dado que MT1-MMP se auto-procesa durante su actividad degradativa, la internalización y posterior degradación de MT1-MMP, desde el frente invasivo, serviría para prevenir la acumulación de las formas inactivadas de la metaloproteínasa en estas zonas, permitiendo la llegada de nuevas moléculas en estado activo.

Podemos establecer un fuerte paralelismo entre la homeostasis de MT1-MMP y lo que se ha dado en llamar “constitutive cycling” (CC), descrito para un gran número de proteínas (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). Este tipo de regulación implica la rápida internalización constitutiva, seguida de un lento reciclaje a la superficie; lo que sugiere que la mayor parte de la molécula se encuentra en compartimentos intracelulares. Muchas proteínas, además de estar implicadas en este tipo de ciclos de reciclaje se encuentran almacenadas en un compartimento de secreción vesicular que se moviliza directamente a la superficie en respuesta a estímulos. De esta forma se logra un cambio rápido de su expresión en membrana, generando compartimentos intracelulares de rápida síntesis disponibles para su inmediata inserción en membrana. Este ciclo constitutivo es un proceso bastante caro en términos energéticos, porque tanto la endocitosis, como la exocitosis, requieren del gasto de GTP y ATP. Este tipo de sistemas biológicos que ocurren cíclicamente, y sólo gastan energía, se han denominado “ciclos en vano” (futile cycles), y presentan la gran ventaja de conferir sensibilidad al sistema. De esta forma, un ligero cambio en la tasa de reacción genera un fuerte cambio en el flujo neto (Stryer, 1988). Así, el coste energético se vería recompensado con un incremento en la sensibilidad del sistema. Este tipo de compartimentos cobra especial

relevancia cuando se trata de una molécula cuya expresión en membrana supone importantes implicaciones funcionales, como es el caso de MT1-MMP.

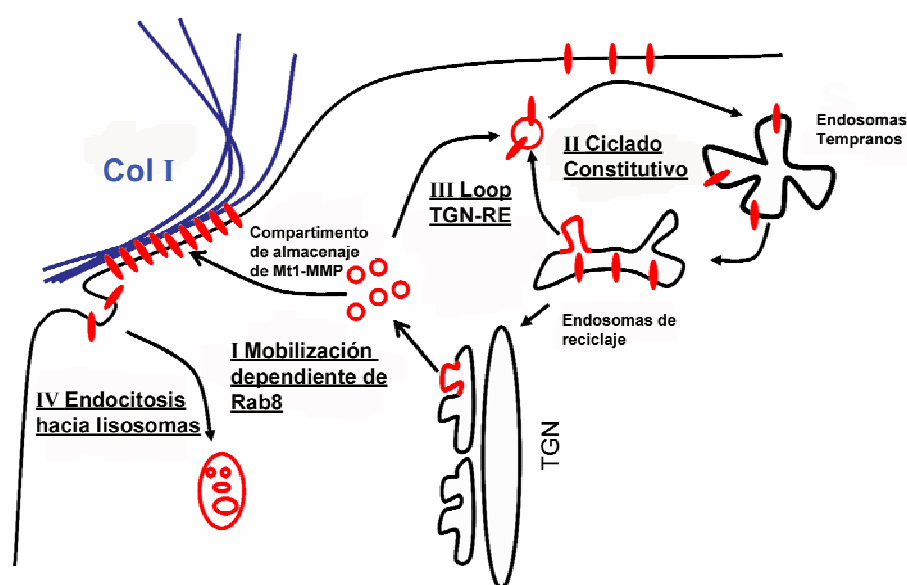
Basándonos en los resultados obtenidos, podemos proponer que MT1-MMP sigue un comportamiento de tipo “constitutive cycling”. En ausencia de estímulo MT1-MMP se encontraría en un estado estacionario de internalización/reciclaje, mientras que la aparición de un estímulo, como la adhesión vía integrinas a la matriz de colágeno, desequilibra el sistema hacia un predominio de exocitosis procedente de los compartimentos de almacenaje intracelular.

Se puede establecer un gran paralelismo entre MT1-MMP y otras proteínas que presentan una regulación similar a través de “constitutive cycling”. Este es el caso de GLUT4, un transportador de glucosa que sufre una rápida internalización y un lento reciclaje hacia la membrana en condiciones basales, encontrándose predominantemente en compartimentos intracelulares (Dugani and Klip, 2005). Además de estar sujeto a este continuo reciclaje, hay un compartimento estable de reserva de GLUT4 disponible para ser movilizado directamente hacia la membrana plasmática en respuesta a la estimulación por insulina. Este paralelismo sugiere que ambas proteínas siguen las mismas rutas de tráfico intracelular, lo cual viene sustentado por el hecho de que MT1-MMP y GLUT4 se localizan en vesículas positivas para Rab8 (Miinea et al., 2005), y su transporte a membrana es dependiente de syntaxina-4 (Miyata et al., 2004; Widberg et al., 2003).

### 1.3 Modelo para el tráfico de MT1-MMP

Todas las evidencias anteriores apoyan claramente nuestras observaciones y nos permiten proponer una nueva regulación de MT1-MMP (Fig. 25). En este modelo destacamos diferentes rutas de tráfico: (i) la exocitosis de MT1-MMP desde compartimentos internos de almacenaje, diferentes de los compartimentos de reciclaje. Esta ruta sería la encargada del reclutamiento polarizado de MT1-MMP hacia zonas invasivas ancladas a matriz extracelular; y estaría regulada por Rab8; (ii) el reciclaje constitutivo tendría lugar en una célula en estado estacionario, en ausencia de estímulo, donde MT1-MMP no se vería implicada en la degradación de matriz, encontrándose en los compartimentos de reciclaje; (iii) no podemos descartar la posibilidad de que, al igual que para GLUT4 y Rab8, haya un bucle de transporte de MT1-MMP entre el compartimiento de almacenaje y los endosomas de reciclaje; (iv) la endocitosis de MT1-

MMP, y posterior degradación en los lisosomas, sería un posible mecanismo de retirada de MT1-MMP, que ha sufrido auto-degradación, y por tanto la inactivación durante el proceso de invasión. Este modelo mantendría a MT1-MMP alejado de la membrana plasmática, donde podría desencadenar efectos laterales, siendo éste un sistema muy sensible para la rápida movilización y localización de MT1-MMP, sin necesidad de llevar a cabo una síntesis *de novo* de la proteína.



**Figura 25.** Modelo para el tráfico intracelular de MT1-MMP. El modelo muestra dos rutas intracelulares principales (I) La exocitosis de MT1-MMP regulada por Rab8 desde un compartimiento biosintético inducido por la unión a colágeno en células invasivas. (II) Ciclo constitutivo, desde endosomas de reciclaje, en células estacionarias, donde MT1-MMP no se encuentra anclado a matriz. Rutas alternativas pueden implicar: (III) transporte entre la red del trans-Golgi y los compartimentos de reciclaje y (IV) endocitosis hacia lisosomas para la degradación de MT1-MMP implicada en la degradación de colágeno.

## 2. Rab8 EN INVASIÓN TUMORAL: REGULACION DEL TRANSPORTE DE MT1-MMP

Rab8 pertenece a la familia de las GTPasas Rab, que son proteínas reguladoras del tráfico celular en células eucariotas (Zerial and McBride, 2001). Rab8 se describió como un oncogén aislado de una línea de melanoma, (Nimmo et al., 1991), aunque su relevancia en cáncer no había sido establecida todavía. Además, Rab8 se encuentra sobreexpresado en diferentes tumores según hemos constatado en la base de datos de

microarrays ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)). Aunque la ruta regulada por Rab8 no está clara, hay evidencias de que está implicada en el transporte de proteínas hacia protrusiones de membrana (Ang et al., 2003; Hattula et al., 2002; Peranen et al., 1996). Nuestros resultados demuestran la implicación de Rab8 en la regulación del tráfico de MT1-MMP hacia estructuras invasivas, así como en la degradación de colágeno, y en la invasión dependiente de MT1-MMP.

La co-localización de MT1-MMP con Rab8, tanto en vesículas intracelulares como en estructuras claramente invasivas, como es el caso de los fragmentos liberados por las células durante la invasión, ponen de manifiesto la presencia de ambas proteínas en el mismo compartimiento celular. El requerimiento de la actividad de Rab8 sobre la capacidad invasiva de MT1-MMP se muestra en los experimentos en los que el silenciamiento de Rab8 impide: (i) la invasión y la colagenolisis dependiente de MT1-MMP, y (ii) el reclutamiento de MT1-MMP inducido a microesferas de colágeno. Esto revela el papel de esta GTPasa en la regulación del transporte de MT1-MMP. Todos estos experimentos indican que Rab8 juega un papel importante en la invasión tumoral, regulando el transporte de MT1-MMP, una de las enzimas claves de este proceso, hacia las estructuras invasivas.

Rab11a pertenece a la familia de las Rab11 GTPasas (Rab11a, Rab11b, Rab25) (Goldenring et al., 2001). Se describió como una GTPasa que regula el reciclaje de proteínas desde los endosomas hasta la membrana plasmática, y desde los endosomas, hacia la región del TGN (Wilcke et al., 2000). La ausencia de colocalización de MT1-MMP con Rab11 en 3D-Col I descarta la implicación de Rab11, y por lo tanto de la ruta de reciclaje, en el transporte de MT1-MMP hacia la membrana plasmática durante la invasión. Para descartar definitivamente la implicación de Rab11, tanto en invasión, como en colagenolisis y reclutamiento de MT1-MMP a microesferas, se utilizaron shRNA para Rab11, que no afectó en el reclutamiento y actividad de MT1-MMP.

Podemos, de alguna manera, especular sobre los eventos que llevarían al reclutamiento de MT1-MMP hacia estas estructuras invasivas. Como describimos anteriormente, la unión de la célula a la matriz extracelular y la activación de las integrinas induciría el cambio de ruta de transporte intracelular de MT1-MMP, desde el compartimento de reciclaje al de almacenaje, que implicaría un transporte exocítico a las nuevas estructuras invasivas. Rab8 se podría estar activando a través de un Rab8-GEF, en compartimentos intracelulares, para ser transportado junto con MT1-MMP y, posiblemente otras proteínas relevantes en los procesos de adhesión y motilidad celular,



hacia las zonas de contacto con el colágeno para permitir la invasión. Recientemente se ha descrito un efector de Rab8: JFC-1 (proteína humana homóloga a sinaptotagmina-1 de ratón), implicado en la formación del complejo de exocitosis (Hattula et al., 2006). La proteína JFC-1 se une a Rab8-GTP favoreciendo la fusión de vesículas con la membrana plasmática, y posiblemente la inmersión de MT1-MMP en esta. De forma adicional, Rab8 se podría estar activando a su llegada a la membrana plasmática para inducir el proceso de fusión exocítica de la vesícula. En este sentido se ha descrito un nuevo GEF de Rab8, MSS4 (Knoblauch et al., 2007). Este GEF se une a la cola citoplásmica de la subunidad  $\alpha$  de las integrinas  $\alpha 3A$ ,  $\alpha 6A$ ,  $\alpha 7A$  y  $\alpha 7B$  formando un complejo MSS4/integrina que es capaz de reclutar MT1-MMP. El sitio de unión de MSS4 a la integrina es el mismo que utiliza para unirse a Rab8, siendo la unión de MSS4 a ambas proteínas de naturaleza competitiva. Posiblemente, MSS4 u otros GEFs permitan la activación de Rab8 en las zonas de membrana ancladas a sustrato, y la fusión de las vesículas que contienen MT1-MMP con la membrana plasmática, promoviendo así el reclutamiento específico de MT1-MMP en zonas de adhesión mediada por integrinas.

### 3. PAPEL DE Rab8 EN MIGRACION TUMORAL

Bretscher fue el primero que en la década de los 70 propuso que la endocitosis de membranas en toda la célula, y la exocitosis en el frente celular, generarían un flujo de membranas que dirigirían el movimiento celular (Bretscher, 1976). Si bien esta hipótesis no se ha demostrado fehacientemente, diferentes trabajos implican a la ruta exocítica en la migración celular. Estudios realizados en neuronas destacan a esta ruta como un componente fundamental en el establecimiento de la polaridad celular (Bradke and Dotti, 1997; Lai and Jan, 2006).

En plantas también cobra gran relevancia el transporte exocítico. En la polinización, el crecimiento del tubo del grano de polen está dirigido por el transporte exocítico hacia la zona de crecimiento, que incorpora nuevo material a la pared celular. Este transporte está regulado por el calcio citosólico y por la actividad de GTPasas de la familia Rab y Rop (proteínas homólogas a las Rho GTPasas en plantas) (Camacho and Malho, 2003).

En este sentido, nuestros resultados no sólo ponen de manifiesto la importancia de la ruta de exocitosis en migración, sino que profundizan en su mecanismo molecular al revelar la implicación de Rab8 en el establecimiento de la polaridad y la migración.

No existe ninguna evidencia anterior a nuestro trabajo que demuestre que Rab8 está implicada en la motilidad celular, si bien, su papel en este proceso se ha propuesto por diferentes autores; esto es debido, principalmente, a su localización en las protrusiones de membrana, y regulación del transporte exocítico de proteínas hacia estas zonas (Hattula et al., 2006; Peranen et al., 1996). El trabajo presentado en esta tesis demuestra que Rab8 es necesario para: (i) el establecimiento de la polaridad y la elongación celular, (ii) la persistencia de la migración, y (iii) para la respuesta a estímulos migratorios externos. Asimismo, constatamos que Rab8 actúa en estos procesos promoviendo la reorganización del citoesqueleto de actina y de las adhesiones focales, a través de la regulación de las GTPasas de la familia Rho.

#### 3.1 Papel de Rab8 en polarización celular

Como polarización celular nos referimos a la habilidad de las células para mantener una asimetría celular durante el proceso de migración, estableciendo dos polos bien definidos, uno anterior y otro posterior. Existen múltiples factores que intervienen

en la polarización celular, pero el desencadenante inicial que determina el establecimiento de la polaridad es un estímulo migratorio que activa la señalización intracelular. Este estímulo puede ser desde la presencia de agentes quimiotácticos, hasta la generación de una herida en una monocapa de células. En neutrófilos, las células de mamífero en la que los mecanismos de migración direccional y polarización han sido mejor caracterizados, se producen una serie de señales de activación e inactivación que están íntimamente relacionadas determinando la polaridad celular (Wang et al., 2002; Xu et al., 2003). En este sentido la producción de fosfoinosítidos por las PI3Ks, en respuesta a agentes quimioatrayentes, es de vital importancia para mantener la persistencia de la polaridad y la migración dirigida (Wang et al., 2002), orientando y estabilizando el frente de avance. Muchas de las rutas de señalización intracelular implicadas convergen en la activación de las Rho GTPasas. Las PI3Ks activan Rac a través de la activación de diferentes GEFs como  $\beta$ PIX (Li et al., 2003), que son transportados a la membrana plasmática donde se unen a fosfoinosítidos. Además, Rac puede activar a PI3K, al ser esta kinasa un efector directo de Rac (Bokoch et al., 1996). Simultáneamente, las rutas de señalización dependientes de Rho juegan un importante papel en la estabilización de la zona de retracción (Xu et al., 2003). Durante años se ha pensado que ambas zonas, anterior y posterior, tiene una regulación antagónica. Es decir, Rac se activaría en el frente de avance inactivándose Rho en esta zona, mientras que Rho se activaría en la zona posterior, donde Rac se encontraría inactivado, manteniendo de esta forma la polaridad celular.

En los procesos de migración, también es necesario que la célula redistribuya una serie de proteínas hacia el frente de avance. En *D. Melanogaster*, por ejemplo, cuando determinadas células migran hacia el oocito, disponen de receptores tirosina quinasa para mantener la señalización en el frente de avance (Jekely et al., 2005). Algunos trabajos, ya describen el movimiento de vesículas desde la red del TGN hacia zonas de membrana situadas en el lamelipodio (Prigozhina and Waterman-Storer, 2004; Schmoranz et al., 2003). Las proteínas Rab que regulan el tráfico de membranas están implicadas en una serie de funciones celulares, como el mantenimiento de la polaridad de células epiteliales y la secreción. Recientemente se ha descrito la implicación de algunos miembros de esta familia en la motilidad celular, estando implicados en las rutas de endocitosis y reciclaje. Rab21 regula el tráfico de integrinas estimulando la migración celular en ensayos de herida (Pellinen et al., 2006). Rab5 induce la formación de lamelipodios a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo la

migración celular (Spaargaren and Bos, 1999); y Rab4 interviene en el mantenimiento de la persistencia de la migración a través del reciclaje de integrinas  $\alpha\text{v}\beta 3$  (White et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento, no se había implicado a una GTPasa de la familia Rab, que regule del tráfico exocítico, en el establecimiento de la polaridad y direccionalidad celular.

La polaridad celular, además de basarse en el establecimiento de una bipolaridad antero-posterior, está asociada a la generación de un frente de avance y la supresión de protrusiones laterales (Nabi, 1999). La polaridad está asociada también con la orientación del Golgi y del centrosoma, estos se orientan frente al núcleo en la dirección de la migración (Euteneuer and Schliwa, 1992; Kupfer et al., 1982). Esta reorientación que no se observa en estas células silenciadas para Rab8, lo que demuestra el papel de esta GTPasa en el establecimiento de la polaridad. Poco se conoce acerca de las rutas de señalización que se inician durante la generación de una herida en una monocapa de células, pero podemos postular que Rab8 estaría activándose en respuesta a este estímulo migratorio, para promover el transporte exocítico de moléculas al frente de avance, y establecer una polaridad celular.

### 3.2 Rab8 regula la actividad de las Rho GTPasas, afectando al citoesqueleto y la migración celular

La primera evidencia descrita acerca de la sobreexpresión de Rab8 es la reorganización del citoesqueleto de actina generando nuevas protrusiones, así como la desaparición de fibras de estrés (Hattula et al., 2006; Peranen et al., 1996). Estos efectos fenotípicos fueron reproducidos en nuestro modelo experimental. Además, hemos podido observar como Rab8 interviene en la formación de las adhesiones focales, que anteriormente no se había descrito para esta GTPasa.

Los experimentos de *pull-down* en células que expresan Rab8Q67L muestran un aumento de la actividad de Rac en estas células. Estos resultados explicarían el fenotipo observado en células que sobreexpresan Rab8, puesto que la generación de lamelas, características de Rab8Q67L, así como la formación de pequeños complejos focales, que representarían fases tempranas de la maduración de la adhesión focal, se han descrito como estructuras inducidas por Rac (Raftopoulou and Hall, 2004).

Hay numerosas evidencias que demuestran el antagonismo entre Rho y Rac (Burridge and Wennerberg, 2004; Nimnual et al., 2003; Rottner et al., 1999; Sander et

al., 1999; Xu et al., 2003). El hecho de que el mutante activado de Rho (RhoV12) inhiba el fenotipo inducido por Rab8Q67L, y el mutante constitutivamente activo de Rho (Rho N19) revierta el fenotipo de shRNARab8, nos hace pensar que Rab8 va a mediar sus efectos a través de la regulación de la actividad de ambas GTPasas; si bien hasta el momento no hemos podido demostrar como Rab8 regula la actividad de Rho.

Una de las teorías más establecidas es que Rac produce la inhibición de Rho a través de p190 RhoGap. La generación de especies reactivas de oxígeno mediadas por Rac inhibe a LMW-PTP, una fosfatasa que defosforila p190 RhoGap, produciendo un incremento en la fosforilación de p190 RhoGap, que produciría su activación; esto conllevaría la inhibición de Rho (Nimnual et al., 2003). Nuestros resultados sugieren que Rab8 actúa a través de la inhibición de Rho, puesto que el fenotipo de Rab8Q67L es revertido por el mutante constitutivamente activo de Rho, RhoV14. Esta inhibición de Rho podría ser directa o estar mediada por un aumento en la actividad de Rac a través de p190 RhoGap. En células silenciadas para p190 RhoGap, Rab8Q67L es incapaz de generar el fenotipo característico anteriormente descrito, sugiriendo una dependencia de p190 RhoGap para la inhibición de Rho. La actividad de Rho en estas células estaría aumentada, y Rac, previamente activado por Rab8, no podría inhibir Rho al carecer estas células de p190 RhoGap, viéndose revertido el fenotipo. Estos datos demuestran que Rho, además de Rac, juega un papel importante en los reordenamientos del citoesqueleto mediados por Rab8.

En ausencia de estímulos externos, las células se polarizan espontáneamente, y migran de una manera dirigida usando las mismas rutas de señalización que las rutas activadas en respuesta a agentes quimiotácticos. La señalización mediada por integrinas es crucial para la persistencia de la migración celular, generando gradientes de activación entre el frente celular y la zona trasera. Rac y Cdc42 se activarían en el frente de avance, mientras que Rho se activaría en la parte trasera, si bien la regulación de Rho parece más controvertida, pudiendo estar este activado en el frente de avance celular (Kurokawa et al., 2005; Pertz et al., 2006). Células silenciadas para Rab8 muestran una pérdida de la persistencia de la migración cuando se someten a experimentos de migración en ausencia de estímulo. El desequilibrio en la actividad de las Rho GTPasas en los polos celulares podría ser el responsable de esta pérdida de direccionalidad. Estas células serían incapaces de activar Rac e inhibir Rho eficientemente en el frente de avance celular, y por tanto, al no polarizarse correctamente, la dirección del movimiento estaría desregulada. Asimismo, células que

sobreexpresan Rab8Q67L muestran también una ligera pérdida de direccionalidad. Este hecho puede ser explicado en base a los altos niveles de Rac activo que dichas células mantienen. La elevada actividad de Rab8, y por tanto de Rac, en diferentes localizaciones de la membrana, no permitiría a la célula establecer un frente de avance que dirigiera la motilidad. En concordancia con estos resultados, recientemente se ha descrito que células con alta actividad de Rac presentan una inhibición de la persistencia de la migración (Pankov et al., 2005). Proponemos un importante papel de Rab8 en el establecimiento del frente de avance, inducido por la formación de contactos adhesivos que permitiría la estabilización de la dirección del movimiento celular. Allí Rab8 induciría la reorganización del citoesqueleto celular, a través de la regulación de la actividad de las GTPasas. Hasta ahora hemos comprobado que Rab8 estaría activando Rac en el frente de avance celular, y aunque no tenemos hasta el momento evidencias, también postulamos que Rab8 estaría inhibiendo Rho en el frente de avance.

Estos resultados muestran que Rab8 juega un papel clave en el establecimiento de la estructura del frente de avance celular, promoviendo la generación de protusiones y la reorganización del citoesqueleto de actina, a través de la activación de Rac. Apoyando esta hipótesis, células silenciadas para Rab8 son incapaces de responder a estímulos migratorios, y por tanto, incapaces de cerrar la herida causada en la monocapa, así como incapaces de responder a estímulos que inducen la polarización y la migración, como el EGF. Rab8 sería fundamental para mantener la señalización de Rho/Rac en el frente de avance, activando Rac e inhibiendo Rho. Aunque no tenemos datos concluyentes al respecto, el efecto de la activación y del silenciamiento de Rab8 sobre las fibras de estrés y adhesiones focales, y la inhibición de estos fenotipos por el mutante constitutivamente activo y el mutante inactivo de Rho, respectivamente, sugieren que Rab8 juega un papel importante en la inhibición de Rho, aunque este podría ser indirecto a través de la activación de Rac.

### 3.3 Rab8 y el desensamblaje de la adhesión focal

El desensamblaje de la adhesión focal es un proceso esencial para la migración celular cuyo mecanismo no está establecido hasta el momento, estando sujeto a controversia en la actualidad. La dinámica de la adhesión focal está regulada por las Rho GTPasas. Rac y Cdc42 inducen la formación de los complejos focales en primera instancia, complejos que posteriormente madurarán a adhesiones focales, de forma Rho

dependiente. La última fase en la vida de la adhesión focal sería su desensamblaje, que permitiría la de-adhesión del sustrato en la parte trasera de la célula. Numerosos trabajos demuestran la importancia de los microtúbulos en el proceso de desensamblaje de la adhesión focal (Ezratty et al., 2005; Kaverina et al., 1999; Small and Kaverina, 2003). En estos trabajos se demuestra que los microtúbulos transportan impulsos de relajación a la adhesión focal, permitiendo su desensamblaje. Se ha implicado a motores moleculares como la Kinesina-1 en este fenómeno (Krylyshkina et al., 2002), que transportaría a la adhesión focal moléculas que son necesarias para su desensamblaje; y a enzimas como la calpaina, proteasa que degrada diferentes componentes de la adhesión focal como ezrina, talina o integrinas (Bhatt et al., 2002). Otras teorías proponen que los microtúbulos regularían este fenómeno produciendo un desequilibrio de las GTPasas Rho y Rac en las inmediaciones de la adhesión, promoviendo la catástrofe de esta (Enomoto, 1996; Sander et al., 1999). Esta teoría ha sido revisada en un reciente trabajo, al observarse que el fenómeno del desensamblaje es independiente de GTPasas, y dependiente de otras moléculas que median procesos de tráfico de membrana endocítico, como dinamina-1 (Ezratty et al., 2005).

En este trabajo hemos demostrado que Rab8 es necesario para el desensamblaje de estas estructuras, siendo esta la primera evidencia que muestra que una GTPasa implicada en tráfico vesicular se relaciona con un proceso como es el recambio de adhesiones focales. Rab8 podría promover el recambio de estas estructuras a través de: (i) la inactivación de Rho, aunque los estudios realizados por Ezratty y col. indicarían que este proceso es Rho-independiente y descartarían esta hipótesis, o (ii) transportando proteínas a la adhesión focal, que serían importantes para su desensamblaje, estas serían el factor de relajación del que anteriormente hemos hablado. Uno de los factores de relajación que podría ser transportado por Rab8 a la adhesión focal es MT1-MMP. Nuestro trabajo demuestra la implicación de Rab8 en el reclutamiento de MT1-MMP a membrana. Además, recientemente se ha implicado a esta enzima en el desensamblaje de las adhesiones focales (Takino et al., 2004; Takino et al., 2006). Para explorar el posible papel de MT1-MMP en el desensamblaje de la adhesión focal mediado por Rab8, realizamos experimentos en células de melanoma silenciadas para MT1-MMP (datos no mostrados). La sobreexpresión de Rab8Q67L en estas células inducía una desaparición de las adhesiones focales similar a la que se producía en células con MT1-MMP sin silenciar. Estos resultados sugieren que además de MT1-MMP, Rab8 podría transportar otras proteínas a la adhesión focal, que estarían implicadas en el

desensamblaje de ésta; o bien, que el papel de Rab8 en el desensamblaje estaría mediado por el desencadenamiento de una cascada de transducción de señales que llevaría a la catástrofe de la adhesión focal.

En resumen, podemos concluir que Rab8 tiene una función importante en migración, interviniendo en el establecimiento de la polaridad celular. A través de la activación de Rac, Rab8 permitiría la generación de protrusiones de membrana y la formación de los complejos focales en el frente de avance celular. Podríamos postular que Rab8 se activaría en la zona de adhesión donde desencadenaría la cascada de señalización que llevaría a los reordenamientos del citoesqueleto, encaminados a la formación de una nueva protrusión. El mecanismo molecular mediante el cual Rab8 lleva a cabo esta función requiere de un estudio en profundidad. Rab8 podría regular la actividad de Rac localizando un GEF específico de Rac en la zona de avance de la célula, que permitiría elevar la actividad de esta GTPasa para generar una nueva protrusión. Adicionalmente, transportaría una proteína que promovería el desensamblaje de la adhesión focal, así estaría implicada en la de-adhesión necesaria para el avance celular. De esta forma Rab8 actuaría promoviendo la formación y estabilización del frente de avance, y por otra parte, participaría en la liberación de los contactos con el sustrato en la zona de retracción para permitir la migración direccional de la célula.

El gen de Rab8, denominado MEL, se localizó en el cromosoma 19cen-p13.2 (Nimmo et al., 1989; Spurr et al., 1986), una región implicada en translocaciones en una gran variedad de neoplasias, incluidas melanoma (Parmiter et al., 1986) y carcinoma de célula-pequeña de pulmón (Whang-Peng et al., 1986). Además, en numerosos tumores humanos se han descrito alteraciones en este gen, según bases de datos de microarrays. La malignidad de estos tumores se puede deber al papel que Rab8 tiene en migración e invasión. En este caso, la sobre-activación de Rab8 llevaría a una desregulación del ciclo migratorio, y a un aumento de la invasividad, tal y como describimos en este trabajo, que dotaría al tumor de un fenotipo más agresivo. Por lo tanto, Rab8 podría constituir una nueva diana para prevenir la invasión y metástasis; aunque será necesario un importante trabajo futuro que implique modelos animales para validar Rab8 como nueva diana terapéutica en la lucha contra el cancer.



## ***VI. Conclusiones***

De los resultados obtenidos y la discusión presentada podemos extraer las siguientes conclusiones referentes al primer bloque de objetivos:

1. MT1-MMP es reclutado a las estructuras invasivas, a través de la ruta de tráfico exocítico de vesículas, cuando la célula se encuentra invadiendo matrices tridimensionales de colágeno.
2. La ruta de tráfico intracelular implicada en el transporte de MT1-MMP cambia, de los compartimentos de reciclaje a la vía biosintética, cuando la célula se encuentra invadiendo matrices tridimensionales.
3. La adhesión vía integrinas, y posterior activación de cascadas de señalización del módulo FAK/Src, así como las GTPasas de la familia Rho están implicadas en el tráfico de MT1-MMP en las estructuras invasivas.
4. La GTPasa Rab8 regula el transporte de MT1-MMP hacia las zonas de degradación de colágeno, así como su capacidad invasiva.

Las conclusiones derivadas del abordaje del segundo objetivo son:

5. La GTPasa Rab8 está implicada en la motilidad celular, siendo necesaria para la persistencia de la direccionalidad, así como para la respuesta quimiotáctica ante estímulos externos.
6. Rab8 es necesaria para la polarización celular.
7. Rab8 regula la actividad de las GTPasas Rho y Rac, promoviendo reordenamientos del citoesqueleto de actina, y regulando la maduración de las adhesiones focales.
8. Rab8 activa la GTPasa Rac.
9. Rab8 está implicado en el desensamblaje de las adhesiones focales.

## ***VII. Bibliografía***

## BIBLIOGRAFÍA

- Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W.R. and Polyak, K. (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, **6**, 17-32.
- Ang, A.L., Folsch, H., Koivisto, U.M., Pypaert, M. and Mellman, I. (2003) The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, **163**, 339-350.
- Ang, A.L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L.J., Pypaert, M., Warren, G. and Mellman, I. (2004) Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol*, **167**, 531-543.
- Angers-Loustau, A., Cote, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A. and Tremblay, M.L. (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol*, **144**, 1019-1031.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moisewitsch, F., Yamada, K.M. and Mueller, S.C. (2006) Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res*, **66**, 3034-3043.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. and Seed, B. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**, 1303-1313.
- Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C. and Huttenlocher, A. (2002) Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci*, **115**, 3415-3425.
- Bishop, A.L. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 241-255.
- Bokoch, G.M., Vlahos, C.J., Wang, Y., Knaus, U.G. and Traynor-Kaplan, A.E. (1996) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*, **315 ( Pt 3)**, 775-779.
- Bourguignon, L.Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H.B., Young, L.J., Muller, W.J. and Cardiff, R.D. (1998) CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol*, **176**, 206-215.
- Bradke, F. and Dotti, C.G. (1997) Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*, **19**, 1175-1186.
- Bravo-Cordero, J.J., Marrero-Diaz, R., Megias, D., Genis, L., Garcia-Grande, A., Garcia, M.A., Arroyo, A.G. and Montoya, M.C. (2007) MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *Embo J*, **26**, 1499-1510.
- Bretscher, M.S. (1976) Directed lipid flow in cell membranes. *Nature*, **260**, 21-23.
- Bretscher, M.S. and Aguado-Velasco, C. (1998) Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 537-541.
- Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M. and Cheresch, D.A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, **92**, 391-400.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 463-518.

- Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*, **116**, 167-179.
- Burton, J.L., Burns, M.E., Gatti, E., Augustine, G.J. and De Camilli, P. (1994) Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *Embo J*, **13**, 5547-5558.
- Calalb, M.B., Zhang, X., Polte, T.R. and Hanks, S.K. (1996) Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**, 662-668.
- Camacho, L. and Malho, R. (2003) Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> and GTPases. *J Exp Bot*, **54**, 83-92.
- Condeelis, J. and Segall, J.E. (2003) Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, **3**, 921-930.
- Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L. (1994) *Robbins pathologic basis of disease*. Saunders, Philadelphia.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. and Yamada, K.M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, **294**, 1708-1712.
- Chabrilat, M.L., Wilhelm, C., Wasmeier, C., Sviderskaya, E.V., Louvard, D. and Coudrier, E. (2005) Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes. *Mol Biol Cell*, **16**, 1640-1650.
- Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Araki, K., Horikawa, T. and Ichihashi, M. (2003) Evidence that the small GTPase Rab8 is involved in melanosome traffic and dendrite extension in B16 melanoma cells. *Cell Tissue Res*, **314**, 381-388.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. and MacDonald, I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-572.
- Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol Cell Biol*, **10**, 6578-6585.
- Chieriegatti, E. and Meldolesi, J. (2005) Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 181-187.
- DeMali, K.A., Wennerberg, K. and Burridge, K. (2003) Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 572-582.
- Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Popoff, M., Boquet, P., Bader, M.F. and Poulain, B. (2000) A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem*, **275**, 7764-7770.
- Driessens, M.H., Stroeken, P.J., Rodriguez Erena, N.F., van der Valk, M.A., van Rijthoven, E.A. and Roos, E. (1995) Targeted disruption of CD44 in MDAY-D2 lymphosarcoma cells has no effect on subcutaneous growth or metastatic capacity. *J Cell Biol*, **131**, 1849-1855.
- Dugani, C.B. and Klip, A. (2005) Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep*, **6**, 1137-1142.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-174.
- Ellerbroek, S.M., Wu, Y.I., Overall, C.M. and Stack, M.S. (2001) Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *J Biol Chem*, **276**, 24833-24842.
- Enomoto, T. (1996) Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct*, **21**, 317-326.
- Euteneuer, U. and Schliwa, M. (1992) Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol*, **116**, 1157-1166.

- Ezratty, E.J., Partridge, M.A. and Gundersen, G.G. (2005) Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol*, **7**, 581-590.
- Feig, L.A. (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol*, **1**, E25-27.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, **3**, 362-374.
- Futter, C.E., Connolly, C.N., Cutler, D.F. and Hopkins, C.R. (1995) Newly synthesized transferrin receptors can be detected in the endosome before they appear on the cell surface. *J Biol Chem*, **270**, 10999-11003.
- Galvez, B.G., Genis, L., Matias-Roman, S., Oblander, S.A., Tryggvason, K., Apte, S.S. and Arroyo, A.G. (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. *J Biol Chem*, **280**, 1292-1298.
- Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F. and Arroyo, A.G. (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol*, **159**, 509-521.
- Geiger, B. and Bershadsky, A. (2001) Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 584-592.
- Geiger, B. and Bershadsky, A. (2002) Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, **110**, 139-142.
- Geisbrecht, E.R. and Montell, D.J. (2002) Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat Cell Biol*, **4**, 616-620.
- Goldenring, J.R., Aron, L.M., Lapierre, L.A., Navarre, J. and Casanova, J.E. (2001) Expression and properties of Rab25 in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Methods Enzymol*, **329**, 225-234.
- Grande-Garcia, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M. and del Pozo, M.A. (2007) Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*, **177**, 683-694.
- Grinnell, F., Ho, C.H., Tamariz, E., Lee, D.J. and Skuta, G. (2003) Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell*, **14**, 384-395.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11821-11827.
- Hattula, K., Furuhielm, J., Arffman, A. and Peranen, J. (2002) A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol Biol Cell*, **13**, 3268-3280.
- Hattula, K., Furuhielm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpaa, K., Laakkonen, P. and Peranen, J. (2006) Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J Cell Sci*, **119**, 4866-4877.
- Hattula, K. and Peranen, J. (2000) FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol*, **10**, 1603-1606.
- Hirokawa, N. and Takemura, R. (2004) Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res*, **301**, 50-59.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M. and Birkedal-Hansen, H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, **99**, 81-92.

- Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I. and Weiss, S.J. (2000) Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol*, **149**, 1309-1323.
- Hotary, K.B., Allen, E.D., Brooks, P.C., Datta, N.S., Long, M.W. and Weiss, S.J. (2003) Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell*, **114**, 33-45.
- Huber, L.A., Dupree, P. and Dotti, C.G. (1995) A deficiency of the small GTPase rab8 inhibits membrane traffic in developing neurons. *Mol Cell Biol*, **15**, 918-924.
- Huttelmaier, S., Bubeck, P., Rudiger, M. and Jockusch, B.M. (1997) Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem*, **247**, 1136-1142.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Itoh, Y. and Seiki, M. (2004) MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem Sci*, **29**, 285-289.
- Itoh, Y. and Seiki, M. (2006) MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol*, **206**, 1-8.
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. and Seiki, M. (2001) Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *Embo J*, **20**, 4782-4793.
- Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R.S., Alexandrov, K. and Rak, A. (2006) Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4. *Embo J*, **25**, 1445-1455.
- Jekely, G., Sung, H.H., Luque, C.M. and Rorth, P. (2005) Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration. *Dev Cell*, **9**, 197-207.
- Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S.J., Keski-Oja, J. and Pei, D. (2001) Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13693-13698.
- Johnson, R.P. and Craig, S.W. (1994) An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem*, **269**, 12611-12619.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H. and Seiki, M. (2001) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, **153**, 893-904.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V. (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol*, **146**, 1033-1044.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V. (2002) Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 746-761.
- Kaverina, I., Rottner, K. and Small, J.V. (1998) Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol*, **142**, 181-190.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O. and Akiyama, T. (2000) Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*, **289**, 1194-1197.
- Keller, R. (2005) Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 533-541.

- Knoblauch, A., Will, C., Goncharenko, G., Ludwig, S. and Wixler, V. (2007) The binding of Mss4 to alpha-integrin subunits regulates matrix metalloproteinase activation and fibronectin remodeling. *FASEB J*, **21**, 497-510.
- Krendel, M., Zenke, F.T. and Bokoch, G.M. (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, **4**, 294-301.
- Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1994) Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett*, **355**, 259-262.
- Krylyshkina, O., Kaverina, I., Kranewitter, W., Steffen, W., Alonso, M.C., Cross, R.A. and Small, J.V. (2002) Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *J Cell Biol*, **156**, 349-359.
- Kupfer, A., Louvard, D. and Singer, S.J. (1982) Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2603-2607.
- Kurokawa, K., Nakamura, T., Aoki, K. and Matsuda, M. (2005) Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem Soc Trans*, **33**, 631-634.
- Lai, H.C. and Jan, L.Y. (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 548-562.
- Lamb, R.F., Hennigan, R.F., Turnbull, K., Katsanakis, K.D., MacKenzie, E.D., Birnie, G.D. and Ozanne, B.W. (1997) AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol*, **17**, 963-976.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.
- Laukaitis, C.M., Webb, D.J., Donais, K. and Horwitz, A.F. (2001) Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol*, **153**, 1427-1440.
- Lawson, M.A. and Maxfield, F.R. (1995) Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature*, **377**, 75-79.
- Leavesley, D.I., Ferguson, G.D., Wayner, E.A. and Cheresch, D.A. (1992) Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J Cell Biol*, **117**, 1101-1107.
- Legg, J.W. and Isacke, C.M. (1998) Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol*, **8**, 705-708.
- Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D. and Keski-Oja, J. (2002) Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, **277**, 8440-8448.
- Lehti, K., Valtanen, H., Wickstrom, S.A., Lohi, J. and Keski-Oja, J. (2000) Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, **275**, 15006-15013.
- Leitinger, B., Hille-Rehfeld, A. and Spiess, M. (1995) Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10109-10113.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K. and Wu, D. (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*, **114**, 215-227.
- Liotta, L.A. (1986) Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res*, **46**, 1-7.



- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H. and Hirschberg, K. (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 557-589.
- Liu, S., Kiosses, W.B., Rose, D.M., Slepak, M., Salgia, R., Griffin, J.D., Turner, C.E., Schwartz, M.A. and Ginsberg, M.H. (2002) A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration. *J Biol Chem*, **277**, 20887-20894.
- Lock, J.G. and Stow, J.L. (2005) Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell*, **16**, 1744-1755.
- Maaser, K., Wolf, K., Klein, C.E., Niggemann, B., Zanker, K.S., Bocker, E.B. and Friedl, P. (1999) Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell*, **10**, 3067-3079.
- Mayer, C., Maaser, K., Daryab, N., Zanker, K.S., Bocker, E.B. and Friedl, P. (2004) Release of cell fragments by invading melanoma cells. *Eur J Cell Biol*, **83**, 709-715.
- Mazzone, M., Baldassarre, M., Beznoussenko, G., Giacchetti, G., Cao, J., Zucker, S., Luini, A. and Buccione, R. (2004) Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *J Cell Sci*, **117**, 6275-6287.
- Miinea, C.P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peranen, J., Lane, W.S. and Lienhard, G.E. (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J*, **391**, 87-93.
- Miyata, T., Ohnishi, H., Suzuki, J., Yoshikumi, Y., Ohno, H., Mashima, H., Yasuda, H., Ishijima, T., Osawa, H., Satoh, K., Sunada, K., Kita, H., Yamamoto, H. and Sugano, K. (2004) Involvement of syntaxin 4 in the transport of membrane-type 1 matrix metalloproteinase to the plasma membrane in human gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 118-124.
- Mizejewski, G.J. (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**, 124-138.
- Moon, S.Y. and Zheng, Y. (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, **13**, 13-22.
- Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I. and Seiki, M. (2002) CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *Embo J*, **21**, 3949-3959.
- Moritz, O.L., Tam, B.M., Hurd, L.L., Peranen, J., Deretic, D. and Papermaster, D.S. (2001) Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic *Xenopus* rods. *Mol Biol Cell*, **12**, 2341-2351.
- Mullins, R.F., Russell, S.R., Anderson, D.H. and Hageman, G.S. (2000) Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *Faseb J*, **14**, 835-846.
- Nabi, I.R. (1999) The polarization of the motile cell. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 12), 1803-1811.
- Nagel, M., Tahinci, E., Symes, K. and Winklbauer, R. (2004) Guidance of mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula requires PDGF signaling. *Development*, **131**, 2727-2736.

- Nakada, M., Yamada, A., Takino, T., Miyamori, H., Takahashi, T., Yamashita, J. and Sato, H. (2001) Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res*, **61**, 8896-8902.
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y. and Chen, W.T. (1997) Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7959-7964.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L. and Faitelson, Y. (2002) CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **39**, 527-579.
- Nimmo, E., Padua, R.A., Hughes, D., Brook, J.D., Williamson, R. and Johnson, K.J. (1989) Confirmation and refinement of the localisation of the c-MEL locus on chromosome 19 by physical and genetic mapping. *Hum Genet*, **81**, 382-384.
- Nimmo, E.R., Sanders, P.G., Padua, R.A., Hughes, D., Williamson, R. and Johnson, K.J. (1991) The MEL gene: a new member of the RAB/YPT class of RAS-related genes. *Oncogene*, **6**, 1347-1351.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J. and Bar-Sagi, D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*, **5**, 236-241.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995a) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*, **23**, 456-459.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995b) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Novick, P. and Zerial, M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 496-504.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C. and Noda, M. (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, **107**, 789-800.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Tsuiki, H., Sasaki, J., Nakao, M., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Nakajima, M. and Saya, H. (1999) CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene*, **18**, 1435-1446.
- Osenkowski, P., Toth, M. and Fridman, R. (2004) Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol*, **200**, 2-10.
- Otey, C.A. and Burridge, K. (1990) Patterning of the membrane cytoskeleton by the extracellular matrix. *Semin Cell Biol*, **1**, 391-399.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K. and Yamada, K.M. (2005) A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol*, **170**, 793-802.
- Parmiter, A.H., Balaban, G., Herlyn, M., Clark, W.H., Jr. and Nowell, P.C. (1986) A t(1;19) chromosome translocation in three cases of human malignant melanoma. *Cancer Res*, **46**, 1526-1529.
- Paulus, W., Baur, I., Beutler, A.S. and Reeves, S.A. (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest*, **75**, 819-826.
- Peck, D. and Isacke, C.M. (1996) CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol*, **6**, 884-890.

- Pellinen, T., Arjonen, A., Vuoriluoto, K., Kallio, K., Fransen, J.A. and Ivaska, J. (2006) Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol*, **173**, 767-780.
- Peranen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R. and Simons, K. (1996) Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J Cell Biol*, **135**, 153-167.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L. and Hahn, K.M. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, **440**, 1069-1072.
- Pinxteren, J.A., O'Sullivan, A.J., Larbi, K.Y., Tatham, P.E. and Gomperts, B.D. (2000) Thirty years of stimulus-secretion coupling: from Ca(2+) to GTP in the regulation of exocytosis. *Biochimie*, **82**, 385-393.
- Prigozhina, N.L. and Waterman-Storer, C.M. (2004) Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol*, **14**, 88-98.
- Rabinovitz, I. and Mercurio, A.M. (1997) The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol*, **139**, 1873-1884.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, **265**, 23-32.
- Ramos, J.W., Whittaker, C.A. and DeSimone, D.W. (1996) Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. *Development*, **122**, 2873-2883.
- Remacle, A., Murphy, G. and Roghi, C. (2003) Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci*, **116**, 3905-3916.
- Ren, M., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Rosenfeld, M., Adesnik, M. and Sabatini, D.D. (1996) In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5151-5155.
- Ridley, A.J. (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*, **2**, 303-310.
- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Roberts, R., Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Veigel, C., Trinick, J., Buss, F. and Kendrick-Jones, J. (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1931-1944.
- Rodriguez-Boulant, E. and Powell, S.K. (1992) Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 395-427.
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V. (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, **9**, 640-648.
- Royle, S.J. and Murrell-Lagnado, R.D. (2003) Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays*, **25**, 39-46.
- Rozanov, D.V., Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Monosov, E.Z., Marchenko, G.N., Quigley, J.P. and Strongin, A.Y. (2001) Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, **276**, 25705-25714.

- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., Allen, E., Chung, D. and Weiss, S.J. (2004) Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*, **167**, 769-781.
- Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J. and Buss, F. (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol*, **169**, 285-295.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1994) A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo J*, **13**, 3748-3756.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. and Collard, J.G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*, **147**, 1009-1022.
- Sato, H., Takino, T. and Miyamori, H. (2005) Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci*, **96**, 212-217.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, **370**, 61-65.
- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R. and Harada, A. (2007) The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*, **448**, 366-369.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R. and Parsons, J.T. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*, **14**, 1680-1688.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587-1609.
- Schmoranzner, J., Kreitzer, G. and Simon, S.M. (2003) Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci*, **116**, 4513-4519.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.
- Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H. (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 549-599.
- Seabra, M.C. and Coudrier, E. (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic*, **5**, 393-399.
- Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., Gotoh, Y., Ihara, S., Nagata, S., Itoh, H., Fukui, Y. and Jessberger, R. (2002) SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature*, **416**, 759-763.
- Siggia, E.D., Lippincott-Schwartz, J. and Bekiranov, S. (2000) Diffusion in inhomogeneous media: theory and simulations applied to whole cell photobleach recovery. *Biophys J*, **79**, 1761-1770.
- Simons, K. and Wandering-Ness, A. (1990) Polarized sorting in epithelia. *Cell*, **62**, 207-210.
- Small, J.V. and Kaverina, I. (2003) Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 40-47.

- Spaargaren, M. and Bos, J.L. (1999) Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell*, **10**, 3239-3250.
- Spurr, N.K., Hughes, D., Goodfellow, P.N., Brook, J.D. and Padua, R.A. (1986) Chromosomal assignment of c-MEL, a human transforming oncogene, to chromosome 19 (p13.2-q13.2). *Somat Cell Mol Genet*, **12**, 637-640.
- Stanton, H., Gavrilovic, J., Atkinson, S.J., d'Ortho, M.P., Yamada, K.M., Zardi, L. and Murphy, G. (1998) The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J Cell Sci*, **111** ( Pt 18), 2789-2798.
- Stein, M.P., Dong, J. and Wandinger-Ness, A. (2003) Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 1421-1437.
- Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y. and Seiki, M. (2005) CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene*, **24**, 859-868.
- Takino, T., Miyamori, H., Watanabe, Y., Yoshioka, K., Seiki, M. and Sato, H. (2004) Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res*, **64**, 1044-1049.
- Takino, T., Watanabe, Y., Matsui, M., Miyamori, H., Kudo, T., Seiki, M. and Sato, H. (2006) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res*, **312**, 1381-1389.
- Tam, E.M., Wu, Y.I., Butler, G.S., Stack, M.S. and Overall, C.M. (2002) Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem*, **277**, 39005-39014.
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A. and Dolo, V. (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, **160**, 673-680.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J. and Kawai, A. (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol*, **126**, 391-401.
- Tuma, P.L. and Hubbard, A.L. (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*, **83**, 871-932.
- Turner, C.E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, **2**, E231-236.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr. and Burridge, K. (1990) Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol*, **111**, 1059-1068.
- Tuxworth, R.I. and Titus, M.A. (2000) Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic*, **1**, 11-18.
- Uekita, T., Itoh, Y., Yana, I., Ohno, H. and Seiki, M. (2001) Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol*, **155**, 1345-1356.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J. and Horwitz, A.R. (2005) Cell migration at a glance. *J Cell Sci*, **118**, 4917-4919.
- Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O.D., Srinivasan, S., Servant, G. and Bourne, H.R. (2002) Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol*, **4**, 513-518.

- Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A.L., Wyckoff, J.B., Sahai, E., Singer, R.H., Segall, J.E. and Condeelis, J.S. (2004a) Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res*, **64**, 8585-8594.
- Wang, X., Ma, D., Keski-Oja, J. and Pei, D. (2004b) Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal. *J Biol Chem*, **279**, 9331-9336.
- Webb, D.J., Parsons, J.T. and Horwitz, A.F. (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol*, **4**, E97-100.
- Weber, G.F., Bronson, R.T., Ilagan, J., Cantor, H., Schmits, R. and Mak, T.W. (2002) Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res*, **62**, 2281-2286.
- Wehrle-Haller, B. and Imhof, B. (2002) The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol*, **12**, 382-389.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 247-288.
- Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A. and Sweeney, H.L. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*, **401**, 505-508.
- Whang-Peng, J., Triche, T.J., Knutsen, T., Miser, J., Kao-Shan, S., Tsai, S. and Israel, M.A. (1986) Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood. *Cancer Genet Cytogenet*, **21**, 185-208.
- White, D.P., Caswell, P.T. and Norman, J.C. (2007) alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol*, **177**, 515-525.
- Widberg, C.H., Bryant, N.J., Girotti, M., Rea, S. and James, D.E. (2003) Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, **278**, 35093-35101.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J. (2000) Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol*, **151**, 1207-1220.
- Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B. and Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*, **271**, 17119-17123.
- Williams, M.J., Hughes, P.E., O'Toole, T.E. and Ginsberg, M.H. (1994) The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol*, **4**, 109-112.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bocker, E.B. and Friedl, P. (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, **160**, 267-277.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F. and Liotta, L.A. (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer*, **80**, 1529-1537.
- Wozniak, M.A., Desai, R., Solski, P.A., Der, C.J. and Keely, P.J. (2003) ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol*, **163**, 583-595.

- Wu, Y.I., Munshi, H.G., Sen, R., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., Fridman, R. and Stack, M.S. (2004) Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, **279**, 8278-8289.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T. and Bourne, H.R. (2003) Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, **114**, 201-214.
- Yamada, K.M., Pankov, R. and Cukierman, E. (2003) Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res*, **36**, 959-966.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*, **13**, 35-48.
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. and Geiger, B. (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci*, **116**, 4605-4613.
- Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K.M., Katz, B.Z., Lin, S., Lin, D.C., Bershadsky, A., Kam, Z. and Geiger, B. (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*, **2**, 191-196.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 107-117.
- Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, **26**, 724-732.
- Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C.E., DiYanni, E.A. and Cao, J. (2002) Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase activation. *Lab Invest*, **82**, 1673-1684.